

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*  
MESTRADO EM BIOTÉCNOLOGIA

**BACTÉRIAS LÁTICAS: AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO TRATO  
GASTRINTESTINAL SIMULADO E ENCAPSULAMENTO COM SOROS LÁCTEOS**

Camila Eckert

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claucia Fernanda Volken de Souza  
(Orientadora)

Lajeado, outubro de 2016.

Camila Eckert

**BACTÉRIAS LÁTICAS: AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO TRATO  
GASTRINTESTINAL SIMULADO E ENCAPSULAMENTO COM SOROS LÁCTEOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claucia Fernanda  
Volken de Souza

Lajeado, outubro de 2016.

## RESUMO

Muitas bactérias lácticas (BALs) são classificadas como probióticas, provendo benefícios à saúde quando ingeridas em quantidades adequadas. Para serem assim consideradas, um dos critérios é sua capacidade de tolerar as condições adversas do trato gastrointestinal humano (TGI). Entretanto, algumas cepas apresentam baixa resistência, sendo necessário proporcionar uma barreira física externa como proteção. Uma das metodologias mais propostas para esta finalidade é o encapsulamento. A técnica de *spray drying* é um dos métodos mais difundidos na indústria de alimentos para este fim. Ainda, outra forma da obtenção de encapsulados é a extrusão por tecnologia de vibração. Os subprodutos da indústria de laticínios são uma alternativa como material encapsulante na aplicação às condições adversas, em função de sua composição e por apresentarem potencial para a proteção dos microrganismos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi selecionar BALs tolerantes às condições ambientais do TGI simulado, visando o encapsulamento por *spray drying* e extrusão por tecnologia de vibração, empregando soros lácteos como material de parede. Desta forma, bactérias lácticas isoladas de leite e queijo, disponíveis comercialmente e de coleções de cultura foram estudadas quanto ao potencial de sobrevivência às condições ambientais do TGI simulado. Bactérias com elevados níveis de viabilidade (acima de 70% de sobrevivência) às condições ácidas (pHs 2,5 e 3) e de alta concentração de sais biliares (0,5% (m/v)) foram selecionadas para encapsulamento. No microencapsulamento por *spray drying*, soro de queijo, permeado de soro e retentado de soro foram utilizados como material encapsulante para proteção de *L. plantarum* ATCC 8014. Soro de queijo e retentado de soro provaram ser o melhores materiais encapsulantes para proteger *L. plantarum* da alta temperatura aplicada no processo. As microcápsulas foram armazenadas por 56 dias a 20 °C, ou inseridas em leite por 42 dias a 4 °C, mantendo, ainda assim, a alta viabilidade celular. Quando expostas ao TGI simulado, apresentaram viabilidade acima de 8 UFC.mL<sup>-1</sup>. As microcápsulas formadas não apresentaram diferenças na morfologia e diâmetro de  $7,0 \pm 1,0 \mu\text{m}$ . No encapsulamento por tecnologia de vibração, soro de queijo e permeado de soro foram combinados com alginato de sódio 1,5% e pectina 1,25%, para proteção de *L. plantarum* ATCC 8014 e isolados *L. paracasei* ML33 e *L. pentosus* ML82. Não houve perda na viabilidade dos microrganismos após este processo de encapsulamento. Quando armazenadas por 28 dias a 4 °C, apresentaram uma redução de 1 ciclo log, indiferente do isolado ou material encapsulante aplicado. Ainda, forneceu proteção na exposição ao TGI simulado, sendo o soro de queijo com melhor efeito protetor. Os encapsulamentos por *spray drying* e extrusão por tecnologia de vibração, assim como os soros lácteos, materiais encapsulantes aplicados, mostraram-se eficientes na proteção de BALs. São uma alternativa de aplicação, visando o aumento da vida de prateleira e proteção às condições adversas, num produto de alto valor agregado.

**Palavras-chaves:** bactérias lácticas; trato gastrointestinal simulado; *spray drying*; extrusão por tecnologia de vibração; soros lácteos.

## ABSTRACT

Many lactic acid bacteria (BALs) are classified as probiotic, providing health benefits when ingested in suitable amounts. To be thus considered, one of the criteria is its ability to tolerate the adverse conditions of the human gastrointestinal tract (GIT). However, some strains have low resistance, being necessary to provide an external physical barrier as protection. One of the most proposed methodologies for this purpose is encapsulation. The spray drying technique is one of the most widespread methods in the food industry for this. Still another way of obtaining encapsulations is the extrusion by vibration technology. Dairy by-products are an alternative as encapsulating material in application to adverse conditions, depending on their composition and potential for protection of microorganisms. Therefore, the objective of this work was to select BALs tolerant to the environmental conditions of the simulated GIT, aiming the encapsulation by spray drying and extrusion by vibration technology, employing dairy whey as a wall material. In this way, commercially available milk and cheese isolated lactic bacteria and culture collections were studied for the potential survival of the simulated GIT environmental conditions. Bacteria with high levels of viability (above 70% survival) to acid conditions (pH 2.5 and 3) and high concentration of bile salts (0.5% (w / v)) were selected for encapsulation. In microencapsulation by spray drying, whey, permeate and retentate were used as encapsulating material to protect *L. plantarum* ATCC 8014. Whey and retentate proved to be the best encapsulating materials to protect *L. plantarum* from high temperature applied in the process. The microcapsules were stored for 56 days at 20 ° C, or inserted into milk for 42 days at 4 ° C, while still maintaining high cell viability. When exposed to the simulated GIT, they presented viability above 8 CFU.g<sup>-1</sup>. The microcapsules formed did not present differences in morphology and diameter of 7.0 ± 1.0 µm. In the encapsulation by vibration technology, whey and permeate were combined with 1.5% sodium alginate and 1.25% pectin, to protect *L. plantarum* ATCC 8014, *L. paracasei* ML33 and *L. pentosus* ML82 isolates. There was no loss in viability of the microorganisms after this encapsulation process. When stored for 28 days at 4 ° C, they showed a reduction of 1 log cycle, regardless of the isolate or encapsulating material applied. Furthermore, it provided protection in the simulated GIT exposure, being whey with the best protective effect. Spray drying and extrusion by vibration technology, as well as dairy whey, applied encapsulating materials, have proved to be effective in protecting BALs. They are an alternative of application, aiming the increase of the shelf life and protection to the adverse conditions, in a product of high added value.

**Key-words:** lactic acid bacteria; simulated gastrointestinal tract; spray drying; extrusion by vibration technology; dairy whey.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Modo de ação dos probióticos.....	19
Figura 2.	Processo de encapsulamento por extrusão.....	27
Figura 3.	Formação de esferas através da extrusão por tecnologia de vibração.....	27
Figura 4.	Etapas do encapsulamento através da extrusão por tecnologia de vibração.....	29
Figura 5.	Processo de encapsulamento por emulsão.....	30
Figura 6.	Processo de encapsulamento por <i>spray drying</i> .....	32
Figura 7.	Processo de encapsulamento por <i>spray freeze drying</i> .....	34
Figura 8.	Fluxograma geral do trabalho.....	42
Figura 9.	Curvas de crescimento dos isolados selecionados para os testes de adesão.....	58
Figura 10.	Adesão de BALs em células Caco-2.....	60
Figura 11.	Viabilidade das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 (log UFC.g <sup>-1</sup> ) durante 56 dias de armazenamento a 20 °C.....	66

Figura 12.	Mudanças no pH e contagem de células viáveis (log UFC.g <sup>-1</sup> ) no armazenamento a 4 °C em leite.....	68
Figura 13.	Viabilidade de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 (log UFC.g <sup>-1</sup> ) durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 0 e 28 dias de armazenamento.....	71
Figura 14.	Microfotografias de MEV das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 obtidas por <i>spray drying</i> .....	74
Figura 15.	Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL <sup>-1</sup> ) obtidos através da extrusão por tecnologia de vibração ao armazenamento.....	80
Figura 16.	Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL <sup>-1</sup> ) obtidos através da extrusão por tecnologia de vibração na exposição ao trato gastrointestinal simulado.....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Microrganismos avaliados quanto às condições ambientais do TGI simulado.....	44
Tabela 2.	Taxa de sobrevivência (%) dos isolados selecionados expostos às condições ambientais do TGI simulado.....	57
Tabela 3.	Índice de adesão de BALs em células Caco-2.....	60
Tabela 4.	Caracterização físico-química do soro de queijo, permeado e retentado utilizados na produção das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014.....	62
Tabela 5.	Viabilidade de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 antes e após <i>spray drying</i> utilizando soro de queijo, permeado e retentado como material encapsulante.....	63
Tabela 6.	Características das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 preparadas com soro de queijo, permeado e retentado..	75
Tabela 7.	Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL <sup>-1</sup> ) antes e após a extrusão por tecnologia de vibração.....	77

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVO .....</b>	<b>15</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
3.1 Bactérias Láticas .....	17
3.2 Probióticos.....	18
3.2.1 Modo de ação dos probióticos.....	19
3.2.2 Avaliação da resistência ao trato gastrointestinal simulado .....	21
3.2.3 Habilidade de adesão da BALs às células do epitélio intestinal .....	23
3.3 Encapsulamento de probióticos .....	25
3.3.1 Métodos de encapsulamento .....	26
3.3.1.1 Extrusão .....	26
3.3.1.1.1 Extrusão por tecnologia de vibração .....	27
3.3.1.2 Emulsificação .....	30
3.3.1.3 Liofilização ( <i>Freeze drying</i> ) .....	31
3.3.1.4 <i>Spray drying</i> .....	31
3.3.1.5 <i>Spray freeze drying</i> .....	33
3.3.2 Tipos de materiais encapsulantes .....	34
3.3.2.1 Soro de queijo .....	37
3.3.2.2 Permeado de soro .....	39

3.3.2.3 Retentado de soro .....	40
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
4.1 Material.....	43
4.2 Avaliação da sobrevivência de BALs ao trato gastrointestinal simulado .....	43
4.2.1 Microrganismos e condições de cultivo .....	43
4.2.2 Sobrevivência ao trato gastrointestinal simulado .....	44
4.2.3 Determinação de células viáveis .....	45
4.3 Curvas de crescimento.....	45
4.4 Capacidade de adesão de BAL em linhagem de Caco-2.....	46
4.4.1 Microrganismos e condições de cultivo .....	46
4.4.2 Cultura da linhagem celular de Caco-2 .....	46
4.4.3 Ensaio de adesão de BALs em Caco-2.....	47
4.5 Encapsulamento de BAL .....	47
4.5.1 Análise físico-química dos subprodutos da indústria de laticínios .....	47
4.5.2 Microencapsulamento de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 por <i>spray drying</i> .....	48
4.5.2.1 Microrganismos e condições de cultivo .....	48
4.5.2.2 Produção de microcápsulas de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 por <i>spray drying</i> .....	48
4.5.2.3 Viabilidade das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014.....	49
4.5.2.4 Sobrevivência das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 ao armazenamento .....	49
4.5.2.5 Sobrevivência e pH das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 em leite.....	50
4.5.2.6 Sobrevivência das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 ao trato gastrointestinal simulado .....	50
4.5.2.7 Caracterização das microcápsulas.....	50
4.5.2.7.1 Morfologia e tamanho de partícula .....	51
4.5.2.7.2 Umidade e atividade de água.....	51
4.5.2.7.3 Análise de cor.....	51
4.5.3 Encapsulamento através da extrusão por tecnologia de Vibração .....	51
4.5.3.1 Microrganismos e condições de cultivo .....	51
4.5.3.2 Produção de encapsulados através da extrusão por tecnologia de vibração.....	52



4.5.3.3 Viabilidade dos encapsulados à extrusão por tecnologia de vibração .	52
4.5.3.4 Sobrevivência dos encapsulados obtidos através da extrusão por tecnologia de vibração ao armazenamento.....	53
4.5.3.5 Sobrevivência dos encapsulados obtidos através da extrusão por tecnologia de vibração ao trato gastrointestinal simulado .....	53
4.6 Análise estatística .....	53
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
5.1 Avaliação da sobrevivência de BAL ao trato gastrointestinal simulado .....	54
5.1.1 Avaliação ao trato gástrico .....	54
5.1.2 Avaliação ao trato intestinal.....	55
5.2 Curvas de crescimento.....	58
5.3 Habilidade de adesão de BALs isoladas .....	59
5.4 Encapsulamento de BALs .....	62
5.4.1 Análise físico-química de subprodutos da indústria de laticínios.....	62
5.4.2 Microencapsulamento por spray drying.....	63
5.4.2.1 Viabilidade das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 após <i>spray drying</i> .....	63
5.4.2.2 Sobrevivência das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 ao armazenamento .....	66
5.4.2.3 Sobrevivência e pH das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> 8014 ao armazenamento em leite.....	68
5.4.2.4 Sobrevivência das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 ao trato gastrointestinal simulado.....	70
5.4.2.5 Caracterização das microcápsulas.....	73
5.4.2.5.1 Morfologia e tamanho de partícula .....	73
5.4.2.5.2 Umidade, atividade de água e análise de cor.....	74
5.4.3 Encapsulamento através da Extrusão por tecnologia de vibração .....	76
5.4.3.1 Viabilidade dos encapsulados após a extrusão por tecnologia de vibração .....	76
5.4.3.2 Sobrevivência dos encapsulados obtidos através da extrusão por tecnologia de vibração ao armazenamento.....	79
5.4.3.3 Sobrevivência dos encapsulados obtidos através da extrusão por tecnologia de vibração ao trato gastrointestinal simulado .....	81

<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO B .....</b>	<b>106</b>
<b>ANEXO C .....</b>	<b>110</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As Bactérias Láticas (BALs) são microrganismos que caracterizam-se pela capacidade de produzir ácido lático a partir do processo de fermentação da lactose. Podem ser classificadas como homofermentativas, quando produzem ácido lático como principal ou único produto resultante da fermentação, ou ainda heterofermentativas, quando produzem, além do ácido lático, outros compostos que podem contribuir para as características de sabor e aroma de produtos lácteos fermentados (JAY, 2000). Estão envolvidas em diversos processos industriais, especialmente na fabricação de derivados lácteos. Além disto, são habitantes normais do trato gastrointestinal humano (TGI), representando a microbiota dominante do intestino delgado (JENSEN et al., 2012).

Algumas BALs são classificadas como probióticas, tendo em vista que possuem entre suas características a capacidade de colonizar e promover o equilíbrio da microbiota intestinal, assim como de exercer um importante papel na prevenção de doenças, já que a ação das células imunes está diretamente associada com a adesão ao epitélio intestinal. O desequilíbrio desse sistema é relacionado a diversas desordens gastrointestinais, como a doença de Crohn e colites ulcerativas (HERMANN et al., 2014; VANDERPOOL; YAN; POLK, 2008). Porém, para produzir estes efeitos benéficos, é essencial que os microrganismos sejam capazes de sobreviver à barreiras biológicas, como aos baixos níveis de pH do estômago e a atuação de enzimas biliares no intestino, estando em elevada quantidade para aderir

à mucosa intestinal. O potencial de adesão de BALs a células do epitélio intestinal tem um papel fundamental na regulação do sistema imune. Da aderência resulta uma interação entre o microrganismo e a superfície da mucosa intestinal, promovendo benefícios na modulação dos efeitos imunológicos e a exclusão competitiva de bactérias patogênicas (DEL PIANO et al., 2006; VANDERPOOL; YAN; POLK, 2008; VARANKOVICH; NICKERSON; KORBER, 2015).

Entretanto, algumas espécies apresentam baixa resistência em processos, produtos alimentares e ao TGI, sendo necessário proporcionar uma barreira física externa como proteção (MARTÍN et al., 2015). O encapsulamento é considerado um métodos adequado para aumentar a resistência de microrganismos sensíveis à condições adversas (VIVEK, 2013). Este processo é definido como uma tecnologia de empacotamento de estruturas em pequenas cápsulas seladas, que liberam seu conteúdo controladamente, sob influência de condições específicas (ANAL; STEVENS, 2005; DESAI; PARK, 2005). O crescente interesse nesta técnica origina-se da falta de estabilidade das células vivas e moléculas funcionais, da necessidade de ação em local específico do organismo, assim como de condições adequadas para seu crescimento (DE VOS et al., 2010; BURGAIN et al., 2011).

Atualmente um dos processos de encapsulamento mais difundidos na indústria de alimentos é a técnica de *spray drying*, que consiste na atomização de um líquido ou uma suspensão em uma câmara de secagem com um ar quente, produzindo partículas secas. Este método é de baixo custo, altamente reprodutível e adequado para aplicações industriais, porém, por aplicar elevadas temperaturas, pode inviabilizar o uso em microrganismos. Entretanto, estudos indicam o uso de temperaturas mais amenas, além da adição de protetores térmicos e de uma escolha adequada do material encapsulante, aumentando a viabilidade dos microrganismos (DE VOS et al., 2010; BURGAIN et al., 2011; IRAVANI; KORBEEKANDI; MIRMOHAMMADI, 2014; MARTÍN et al., 2015; COGHETTO et al., 2016a).

Outra metodologia empregada no encapsulamento é a extrusão por tecnologia de vibração, baseada na ruptura de um escoamento laminar líquido, por uma frequência de vibração com amplitude definida sobreposta. Esta técnica permite a produção de microesferas uniformes e monodispersas, padronizadas e reprodutíveis. Além de operar em ambiente estéril, esse método não afeta a viabilidade celular, já que não faz uso de condições adversas ao microrganismo, sendo ideal para esse fim

(DEL GAUDIO et al., 2005; NEMETHOVA; LACIK; RAZGA, 2014; WHELEHAM; MARISON, 2011). Porém, apesar de resultados promissores, tem se demonstrado de difícil aplicação em larga-escala (COGHETTO; BRINQUES; AYUB, 2016b).

A tecnologia de encapsulamento tem sido muito explorada como uma forma de melhorar a resistência de células probióticas ao TGI, prolongando a sobrevivência de microrganismos em produtos alimentares. Porém, a maioria das tecnologias aplicadas apresentam uma grande dificuldade quando trata-se de ampliar a produção para escala industrial e, da mesma forma, o tamanho da cápsula formada pode afetar a sensorialidade quando aplicada em alimentos (MARTÍN et al., 2015). Com a combinação e o desenvolvimento de novas tecnologias através da pesquisa, cápsulas com melhores propriedades podem ser obtidas e incorporadas a alimentos, conferindo assim uma melhor qualidade ao produto final e atendendo as exigências do consumidor.

A escolha do material de parede é de extrema importância na viabilidade do encapsulado, de forma que a membrana externa proteja o material sensível (AZEREDO, 2005; ANAL; SINGH, 2007). Considerando que as matrizes encapsulantes devam conter ingredientes de qualidade alimentar, o uso de biopolímeros naturais, como proteínas e polissacarídeos, são amplamente utilizados. Desta forma, alginato, carragena, gomas, amido e proteínas do leite são os materiais mais aplicados nesta finalidade (ANAL; SINGH, 2007; ROKKA; RANTAMÄKI, 2010; LIVNEY, 2010; BURGAIN et al., 2011; GARCÍA-CEJA et al., 2015; KRUNIC et al., 2016). No caso das proteínas do leite, uma fonte alternativa e de baixo custo para obtenção são os soros lácteos, subprodutos da indústria de laticínios. Diversos trabalhos aplicam esses subprodutos no encapsulamento de microrganismos (DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012; CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; RIBEIRO et al., 2014; LAVARI et al., 2014; ILHA et al., 2015; LAVARI et al., 2015; HUGO; BRUNO; GOLOWCZYC, 2016), e entre eles destacam-se o soro de queijo e o permeado de soro.

O soro de queijo, principal subproduto da indústria de laticínios, gerado pela fabricação do queijo ou da caseína, apresenta potencial para uso como agente encapsulante, o que pode ampliar a sua utilização e minimizar a quantidade descartada como resíduo (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; RIBEIRO et al., 2014; ILHA et al., 2015). O soro de queijo pode ser ainda submetido ao processo de

ultrafiltração, para recuperação, principalmente, das proteínas que são utilizadas no desenvolvimento de produtos com alto valor agregado. Deste processo resulta o permeado, sendo constituído principalmente por lactose e sais. Este subproduto já vêm sendo utilizado como substrato, em forma de meio de cultivo que permite o crescimento de microrganismos probióticos. Além disso, apresenta a vantagem de ser muito mais econômico quando comparado ao meio comercial *de Man, Rogosa e Shape* (MRS) (MOLLEA; MARMO; BOSCO, 2013; HUGO; BRUNO; GOLOWCZYC, 2016). A sua aplicação como material encapsulante vêm sendo explorada, como forma de oferecer mais uma finalidade a esse subproduto (LAVARI et al., 2015; HUGO; BRUNO; GOLOWCZYC, 2016).

## 2 OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi selecionar BALs tolerantes às condições ambientais do TGI simulado, visando o encapsulamento por *spray drying* e extrusão por tecnologia de vibração, empregando soros lácteos como material de parede.

Os objetivos específicos são:

- Selecionar microrganismos isolados de amostras de leite e queijo do Vale do Taquari e de bactérias lácticas disponíveis comercialmente e de coleções de cultura quanto a tolerância às condições ambientais do trato gástrico e trato intestinal (TGI simulado);
- Avaliar a adesão de BALs selecionadas tolerantes às condições ambientais do TGI simulado em linhagem de adenocarcinoma humano Caco-2;
- Realizar o encapsulamento de BALs selecionadas tolerantes às condições ambientais do TGI simulado;
- Avaliar a viabilidade de utilização de diferentes subprodutos da indústria de laticínios, como soro de queijo, permeado de soro e retentado de soro como material encapsulante;

- Estabelecer as melhores condições de processo para o encapsulamento das BALs selecionadas, através das técnicas de *spray drying* e de extrusão por tecnologia de vibração;
- Avaliar a eficiência dos processos de encapsulamento aplicados em relação a viabilidade dos microrganismos;
- Avaliar a tolerância dos encapsulados às condições ambientais do TGI simulado e estabilidade ao armazenamento, sob diferentes condições de tempo e temperatura.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Bactérias Lácticas

As Bactérias Lácticas (BALs) constituem um grupo de microrganismos composto por 13 gêneros de bactérias gram-positivas, que compreendem *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Tetragenococcus*, *Lactosphaera*, *Vagococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella* (JAY, 2000). Predominam na forma de bastonetes e cocos, não formadoras de esporos, catalase negativa desprovida de citocromos, anaeróbias, porém aero tolerantes, ácido tolerantes e estritamente fermentativas (ANAL; SINGH, 2007). Caracterizam-se por produzir ácido láctico no processo de fermentação da lactose, sendo assim classificadas em dois grupos. As homofermentativas, quando produzem ácido láctico como principal ou único produto resultante da fermentação; ou ainda heterofermentativas, quando produzem, além de ácido láctico, outros compostos, tais como dióxido de carbono, etanol, acetaldeído e diacetil (JAY, 2000).

Estes microrganismos estão envolvidos em diversos processos industriais, principalmente na fabricação de derivados lácteos fermentados. São responsáveis por provocar transformações na matéria-prima, contribuindo para o sabor e textura de produtos fermentados e inibição na deterioração de alimentos causada por outros microrganismos. Devido a isso, é o principal grupo de bactérias utilizado na fermentação de alimentos (IKEDA, 2013). Ainda, são habitantes normais do TGI e

representam a microbiota dominante do intestino delgado (JENSEN et al., 2012; KASSAA et al., 2014).

Algumas BALs são conhecidas por causar efeitos benéficos no hospedeiro, devido a capacidade de colonizar o TGI e promover o equilíbrio da microbiota, além de fornecer uma barreira contra patógenos e modular positivamente o sistema imune auxiliando na prevenção de doenças (DEL PIANO et al., 2006; VANDERPOOL; YAN; POLK, 2008; BURGAIN et al., 2011; HERMANNNS et al., 2014; SARKAR; MANDAL, 2016). Sendo assim, são classificadas como probióticas e seguras para uso em produtos alimentícios (GRAS - *Generally Recognized As Safe*) (MONTEAGUDO-MERA et al., 2012).

### 3.2 Probióticos

Os probióticos são caracterizados como microrganismos vivos que afetam positivamente o hospedeiro, auxiliando no equilíbrio do TGI (FULLER, 1989), quando administrado em quantidades adequadas (FAO/WHO, 2002). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a recomendação diária estabelecida de probióticos deve ser na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  UFC na porção do produto pronto para consumo (Unidade Formadoras de Colônias) (ANVISA, 2008).

Os probióticos incluem uma grande variedade de microrganismos, sendo compostos principalmente por bactérias, mas também por algumas leveduras (BURGAIN et al., 2011; JERONYMO-CENEVIVA et al., 2014). As BALs consideradas probióticas mais aplicadas são principalmente do gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* (ANVISA, 2008; ROKKA; RANTAMAKI, 2010). Porém, *Bacillus cereus* var. *toyo*, *Escherichia coli* cepa nissle, *Propionibacterium freundenreichii* e algumas leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*, entre outras, também são assim classificadas (ANAL; SINGH, 2007; VANDERPOOL; YAN; POLK, 2008; BURGAIN et al., 2011).

Atualmente, a relação entre dieta e saúde têm estimulado o mercado no desenvolvimento de produtos que promovam o bem-estar, exibindo o conceito de alimentos funcionais (MEIRA et al., 2012). Esta definição foi apresentada inicialmente por Roberfroid (2002), e indica um alimento que demonstre satisfatoriamente seu efeito benéfico e nutricional a uma ou mais funções do corpo, sendo relevante para a saúde e bem-estar e/ou na redução do risco de doenças. Os alimentos probióticos

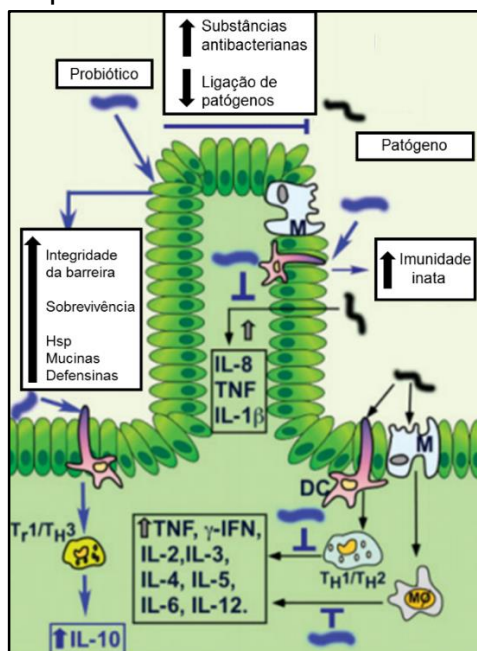
enquadram-se como um importante grupo de alimentos funcionais, e vêm ganhando destaque numa tendência mundial que busca um padrão de dieta saudável como hábito alimentar.

### 3.2.1 Modo de ação dos probióticos

A funcionalidade dos probióticos é caracterizada pela tolerância à pHs ácidos e enzimas pancreáticas presentes no TGI, adesão na mucosa intestinal, produção de componentes antimicrobianos e resistência a certos antibióticos (JERONYMO-CENEVIVA et al., 2014; RUBIO et al., 2014). Já os seus efeitos terapêuticos estão relacionados à redução dos níveis de colesterol e da intolerância à lactose, apresentam potencial na prevenção do câncer e competem pela adesão de microrganismos patógenos ao epitélio do intestino (SAAD, 2006; SOCCOL et al., 2010; BOSCH et al., 2014; JERONYMO-CENEVIVA et al., 2014; RANADHEERA et al., 2014;).

São sugeridos diversos mecanismos pelos quais os probióticos mediam esses benefícios a saúde (Figura 1), entretanto, nem todos os modos de ação são totalmente elucidados (BURGAIN et al., 2011; KENT; DOHERTY, 2014).

Figura 1. Modo de ação dos probióticos



Fonte: Adaptado de Vanderpool; Yan; Polk, 2008.

Entre as suas formas de atuação, destacam-se a modulação positiva do sistema imune do hospedeiro, importante na prevenção e tratamento de doenças infecciosas e processos inflamatórios crônicos do trato digestório. Os probióticos participam na imunomodulação de diversas formas. Essa modulação é resultado da interação entre moléculas presentes na membrana do microrganismo e as células epiteliais, induzindo vias de sinalização do sistema imunológico. Os probióticos tem a capacidade de estimular a resposta da imunidade inata contra microrganismos. Neste caso, as células dendríticas intestinais podem reter bactérias comensais, ativando seletivamente os linfócitos B a produzir IgA e reduzir a penetração da mucosa por bactérias indesejáveis. Ainda, a interação do microrganismo com as células dendríticas (DC) levam a polarização das células T em células T regulatórias e auxiliares (Th1 /Th2/Th3) promovendo a produção de citocinas (TNF, IFN, IL-2, IL-3, IL4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12). As bactérias probióticas podem ser também internalizadas pelas células M e interagir diretamente com as células dendríticas estimulando a produção de citocinas. O probiótico induz a produção de substâncias e componentes citoprotetores nas células humanas (HSP – *heat shock proteins*, Mucinas,  $\beta$ -Defensinas) e bloqueadores de indução de apoptose contribuindo na restituição da barreira epitelial danificada (VANDERPOOL; YAN; POLK, 2008; BURGAIN et al., 2011; SARKAR E MANDAL, 2016).

O mecanismo de exclusão competitiva implica na capacidade do probiótico bloquear as ligações entre os receptores das células epiteliais com microrganismos patógenos, impedindo a aderência dos mesmos. Esse mecanismo envolve a produção de componentes antimicrobianos, tais como ácido lático, ácido acético, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas pelas bactérias probióticas (VANDERPOOL; YAN; POLK, 2008; BURGAIN et al., 2011; JENSEN et al., 2012; MONTEAGUDO-MERA et al., 2012; SARKAR E MANDAL, 2016). Ainda, a microbiota anaeróbia nativa do TGI limita a concentração de patógenos (principalmente aeróbios). Neste caso o restabelecimento do equilíbrio microbiano no intestino é um fator importante (SOCCOL et al., 2010).

Sugere-se também que os probióticos apresentam a capacidade de inativar alguns produtos microbianos, tais como toxinas secretadas por microrganismos patógenos (BURGAIN et al., 2011; JENSEN et al., 2012). Sendo assim, algumas

reações podem resultar na desintoxicação de componentes das células do hospedeiro.

Diversos são os efeitos que determinado probiótico promove sobre o organismo, e esses vão depender de suas propriedades metabólicas, de seus componentes secretados ou ainda das moléculas presentes na superfície epitelial (SOCCOL et al., 2010).

### **3.2.2 Avaliação da resistência ao trato gastrointestinal simulado**

Para promover efeitos benéficos à saúde, é essencial que os probióticos sejam capazes de sobreviver a passagem através do estômago, e atinjam o intestino em quantidades adequadas de células viáveis, sendo capazes de multiplicarem-se no hospedeiro (MARTÍN et al., 2015; COGHETTO; BRINQUES; AYUB, 2016b).

Desta forma, a sobrevivência de bactérias no TGI depende, inicialmente, da sua capacidade de tolerar os baixos níveis de pH do suco gástrico. O ácido clorídrico (HCl) secretado no estômago apresenta pH 0,9, contudo, a presença do alimento no estômago pode aumentar este valor para o nível de pH 3, sendo que, após a ingestão, o alimento permanece de 2 a 4 horas no estômago (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000). A ação do baixo pH constitui-se em uma barreira eficiente contra organismos invasores do trato, impedindo sua colonização no intestino delgado. Sendo assim, para o probiótico sobreviver, é fundamental que ele seja tolerante a essa condição (ALVES, 2013).

Já a presença de sais biliares no intestino apresenta-se como outra barreira biológica na sobrevivência desses organismos. Esses sais são sintetizados a partir do colesterol no fígado, desempenhando um importante papel na emulsificação, solubilização e digestão de lipídios. São armazenados na vesícula biliar e liberados para o intestino delgado após a ingestão de uma refeição rica em gorduras. Os microrganismos probióticos são capazes de hidrolisar esses sais biliares, diminuindo a sua solubilidade e enfraquecendo assim o seu efeito detergente (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000), assumindo-se como um dos critérios para sobrevivência destes ao trato intestinal (ALVES, 2013). No entanto, a resistência aos sais biliares varia muito entre as espécies, sendo 0,3% uma concentração considerada crítica para triagem de microrganismos resistentes (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000).

Estudos recentes investigam a diversidade de BALs com características probióticas desejáveis, visando a aplicação destes em produtos e processos. Ensaio *in vitro*, tais como a tolerância ao TGI e a capacidade de adesão das células ao epitélio intestinal humano são o primeiro passo para conhecer os efeitos desses microrganismos e são largamente aplicados para esta finalidade (BARBOSA et al., 2014; JERONYMO-CENEVIVA et al., 2014; PIENIZ et al., 2014; RANADHEERA et al., 2014; TULUMOĞLU; KAYA; ŞİMŞEK, 2014).

Bao et al. (2010) avaliaram 90 isolados de *Lactobacillus fermentum* de derivados lácteos, quanto a características probióticas desejáveis, entre elas a tolerância ao trato gastrointestinal simulado. Bactérias resistentes a pH 3 foram inicialmente selecionadas, obtendo 35 isolados (38,9%) com adequado nível de crescimento ( $DO_{600\text{ nm}} = 0,5$ ). Estes foram, então, submetidos a presença de 0,3% de sais biliares, mimetizando as condições do trato intestinal. Neste caso, 11 isolados apresentaram boa resistência, com valores acima de 80% de viabilidade ao trânsito gastrointestinal (baixos níveis de pH e presença de sais biliares). Esses isolados apresentam potencial de aplicação em alimentos funcionais.

Jensen et al. (2012) estudaram o potencial probiótico de 18 espécies de *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, *L. sakei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. farciminis* e *L. reuteri*) e *Pediococcus pentosaceus*. Esses microrganismos foram isolados de culturas *starter*, seres humanos ou alimentos e cepas comercialmente disponíveis. Entre os critérios de avaliação, foi realizada a sobrevivência às condições ácidas e presença de sais biliares do TGI. Os microrganismos, quando expostos ao suco gástrico simulado a pH 3 foram separados, de acordo com a sobrevivência, em 3 grupos de tolerância. O primeiro com uma pequena redução de 0,5 log na carga microbiana (*L. reuteri*), seguido de uma redução moderada de 1-2 log (*L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*) e uma grande redução de 4 log (*L. plantarum*) quando comparados ao controle ( $\approx 6$  log UFC/mL). As espécies *L. pentosus*, *L. farciminis*, *L. sakei* não sobreviveram após a incubação. Para as condições de suco intestinal simulado, na presença de 0,45% de sais biliares, todos os isolados apresentaram tolerância, com redução inferior a 1 log UFC/mL.

Da mesma forma, Monteagudo-Mera et al. (2012) testaram o potencial de 11 BALs isoladas de amostras de produtos lácteos e cepas ATCC (*American Type Culture Collection*). Na tolerância ao trato gástrico, a exposição a enzimas e pHs 2,

2,5 e 3 dividiram os microrganismos em 2 grupos distintos em relação a viabilidade. O primeiro grupo, menos resistente, consistindo em diferentes cepas de *Lactobacillus*, apresentaram uma redução de até 4 log na sobrevivência. E o grupo mais resistente contendo cepas de *Lactobacillus lactis*, com redução na faixa de 0,5 log. Já para trato intestinal, os isolados foram expostos a enzimas na presença de 0,1 - 0,4% de sais biliares. Neste caso, todos os isolados mantiveram-se viáveis e uma concentração de 0,15-0,3% de sais foi considerada como adequada para a seleção de bactérias probióticas para uso humano.

Visando o aumento de BALs às condições adversas, uma combinação de duas ou mais cepas podem ser aplicadas. Dessa forma, estudos de uma ampla variedade de microrganismos com efeitos benéficos à saúde têm sido realizados, visando possíveis interações simbióticas entre eles e assim contribuindo no desenvolvimento de novos produtos, potencialmente melhorados, exibindo propriedades funcionais (RANADHEERA et al., 2014).

### **3.2.3 Habilidade de adesão da BALs às células do epitélio intestinal**

O TGI humano é um complexo ecossistema, no qual bactérias residentes e em trânsito coexistem. Essa microbiota executa um papel importante nas funções fisiológicas e metabólicas, que incluem a manutenção do TGI, estando diretamente associado ao sistema imune. O desequilíbrio desse sistema é relacionado a diversas desordens gastrintestinais, que incluem colites ulcerativas, síndrome do intestino irritado, doença de Crohn, entre outros (FOLIGNÉ et al., 2016). As BALs constituem-se a microbiota dominante do intestino delgado, de forma que as células imunes estão diretamente associadas com a mucosa intestinal. Sendo assim, muitas BALs consideradas probióticas tem sido aplicadas como uma terapia alternativa na prevenção dessas doenças (SOCCOL et al., 2010; BARBERI et al., 2015; VARANKOVICH; NICKERSON; KORBER, 2015). Diversos estudos sugerem que mecanismos celulares e moleculares resultantes da interação desses microrganismos com as células epiteliais intestinais regulam a resposta imunológica. Desta forma, citocinas pró e anti-inflamatórias são produzidas (IL-2, IL-8, IL-10, IFN), promovendo a homeostase do sistema imune e contribuindo na manutenção à saúde (DEL PIANO

et al., 2006; VANDERPOOL, YAN E POLK, 2008; VARANKOVICH; NICKERSON; KORBER, 2015).

O potencial de adesão de BALs a células do epitélio intestinal tem um papel fundamental nessa interação e regulação do sistema imune, e é considerado um dos principais critérios na seleção de microrganismos probióticos. *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, principalmente, contribuem para a ação inibidora da colonização de bactérias patogênicas e auxiliam na persistência do probiótico no intestino por um período de tempo prolongado. Os efeitos da adesão de BALs em células epiteliais é amplamente estudado, assim como os mecanismos envolvidos (RIEDEL et al., 2006; VANDERPOOL, YAN E POLK, 2008; VARANKOVICH; NICKERSON; KORBER, 2015). Da aderência resulta uma interação entre a cepa e a superfície da mucosa intestinal, promovendo benefícios na modulação dos efeitos imunológicos e a exclusão competitiva de bactérias patogênicas (SAARELA et al., 2000; FENG et al., 2015).

Considerando a dificuldade de avaliação da propriedade de adesão de BALs *in vivo*, modelos *in vitro* foram desenvolvidos com células epiteliais, e vêm sendo amplamente utilizados. Linhagens como HT-29 e Caco-2, ambas originalmente isoladas de adenocarcinomas colorretais humanos, são modelos comumente aceitos por se diferenciarem em células da mucosa intestinal humana. Essas linhagens expressam, *in vitro*, propriedades morfológicas e funcionais de enterócitos maduros que mimetizam o epitélio intestinal (BIANCHI et al., 2004). Para estudos *in vitro*, a linhagem adenocarcinoma de cólon humano Caco-2 é frequentemente utilizada na avaliação das propriedades de adesão e reações inflamatórias de células epiteliais intestinais (TSAI et al., 2011; ARRIBAS et al., 2012; LEBEER et al., 2012; RANADHEERA et al., 2014; FENG et al., 2015; BELGUESMIA et al., 2016).

Ren et al. (2014) avaliaram a habilidade de 9 isolados de *Lactobacillus* de aderir em células Caco-2. Valores de 73 a 912 bactérias/100 células foram encontrados, demonstrando que os microrganismos apresentam potencial de adesão. Kim; Park; Ji (2003) da mesma forma, caracterizaram o potencial de adesão de *Bifidobacterium* em células Caco-2 e relataram 500 bactérias aderidas/50 células Caco-2 como melhor resultado apresentado. Ainda, Feng et al. (2015) testaram o efeito aderente de 16 *Lactobacillus*, na mesma linhagem celular. Neste estudo, os autores descrevem que



as bactérias foram capazes de aderir a células Caco-2, em uma faixa de 0,45 – 12,27%, relatando que a capacidade de adesão é específica para cada cepa.

### **3.3 Encapsulamento de probióticos**

Diversas abordagens que visam aumentar a resistência de microrganismos sensíveis a condições adversas têm sido propostas, incluindo uma apropriada seleção de cepas resistentes a ácidos e sais biliares, adaptação a condições de estresse e fornecimento de uma barreira física externa, como o encapsulamento (MARTÍN et al., 2015). Este último é, atualmente, um dos métodos utilizados mais eficientes e que vêm demonstrando grande interesse comercial (VIVEK, 2013; MARTÍN et al., 2015).

O encapsulamento é definido como uma tecnologia de empacotamento de sólidos, líquidos ou gases em pequenas cápsulas seladas, que liberam seu conteúdo controladamente sob influência de condições específicas (ANAL; STEVENS, 2005; DESAI; PARK, 2005; ROKKA; RANTAMÄKI, 2010; KENT; DOHERTY, 2014).

A cápsula deve consistir de uma membrana semi-permeável, esférica, fina e forte, envolvendo um núcleo líquido/sólido/gasoso, com um diâmetro que pode variar de alguns microns até milímetros. O tamanho é um fator determinante de sua classificação, e pode apresentar-se em 3 categorias: macroencapsulamento, apresentando cápsulas com diâmetro maior de 5000 µm; microencapsulamento, com diâmetro de 0,2 a 5000 µm; e nanoencapsulamento, aquelas menores de 0,2 µm (AZEREDO, 2005). A sua permeabilidade é influenciada pela liberação controlada, que permite que o material do núcleo seja liberado com o decorrer do tempo ou pela exposição de alguma condição específica, evitando a perda de compostos durante o processamento ou sua utilização inefetiva. Além disso deve ser permeável a nutrientes e metabólitos que irão manter a célula viável dentro da cápsula (AZEREDO, 2005; ROKKA; RANTAMÄKI, 2010; RATHORE et al., 2013).

O encapsulamento de BALs é descrito como uma tecnologia que pode proteger culturas lácticas sensíveis em relação a níveis de oxigênio, ambientes ácidos, congelamento e passagem ao TGI, tornando-se adequado no desenvolvimento de produtos lácteos com características funcionais (SUNOHARA et al., 1995; LEE; HEO, 2000; WENRONG; GRIFFITHS, 2000; SU; LIN; CHEN, 2007). Outras aplicações da tecnologia de encapsulamento são a produção de culturas *starters*, uma combinação

de microrganismos iniciadores do processo de fermentação, de maior viabilidade (VIVEK, 2013), a capacidade de mascarar sabores, odores e cores e o aumento da vida-de-prateleira de alimentos, protegendo contra a perda nutricional (ANAL; SINGH, 2007).

### **3.3.1 Métodos de encapsulamento**

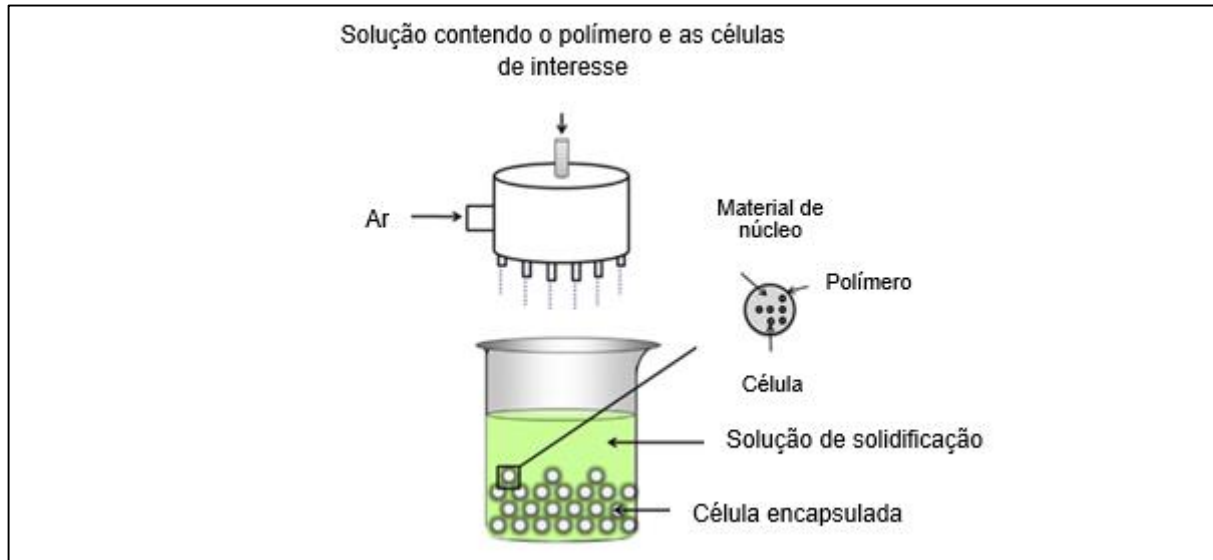
Diversas metodologias são aplicadas na técnica de encapsulamento, sendo relevante na escolha fatores como tamanho da partícula, propriedades físico-químicas do núcleo e material de parede, liberação do conteúdo, aplicação do produto, escala de produção e custo. Além disto, a sua viabilidade vai depender das propriedades físico-químicas da cápsula, como o tipo e a concentração do material de parede, tamanho desejado de partícula e número de células desejadas no interior da cápsula (AZEREDO, 2005; BURGAIN et al, 2011; RATHORE et al, 2013; MARTÍN et al., 2015).

#### **3.3.1.1 Extrusão**

A extrusão é uma técnica física que pode ser utilizada para encapsular materiais biológicos utilizando hidrocolóides como alginato, carragena, pectina, colágeno, entre outros, como material encapsulante (BURGAIN et al., 2011; MARTÍN et al., 2015; COGHETTO; BRINQUES; AYUB, 2016b). O método consiste na projeção de uma solução contendo os microrganismos e o hidrocolóide, através de um bico a alta pressão, produzindo inúmeras gotículas que, em queda livre, caem sobre uma solução de solidificação (Figura 2). A formação das gotículas ocorre de maneira controlada, podendo ser produzida por pulsação do jato ou vibração do bico. Também pode-se utilizar um fluxo coaxial ou campo eletrostático, de forma que quando aplicado, as forças eletrostáticas rompem a superfície do líquido, na ponta da seringa, proporcionando a formação de uma corrente carregada de pequenas gotículas. Este método é simples e barato, e por utilizar uma operação suave, não causa danos as células. Além disso não necessita de solventes orgânicos e apresenta facilidade no controle de tamanho das partículas (geralmente de 2 a 5 mm). (BURGAIN et al., 2011; KENT; DOHERTY, 2014; MARTÍN et al., 2015). O tamanho das cápsulas formadas é dependente da viscosidade do hidrocolóide, do diâmetro do orifício de extrusão e da

distância que as gotículas percorrem até a solução de solidificação (IRAVANI; KORBOKANDI; MIRMHAMMADI, 2014).

Figura 2. Processo de encapsulamento por extrusão

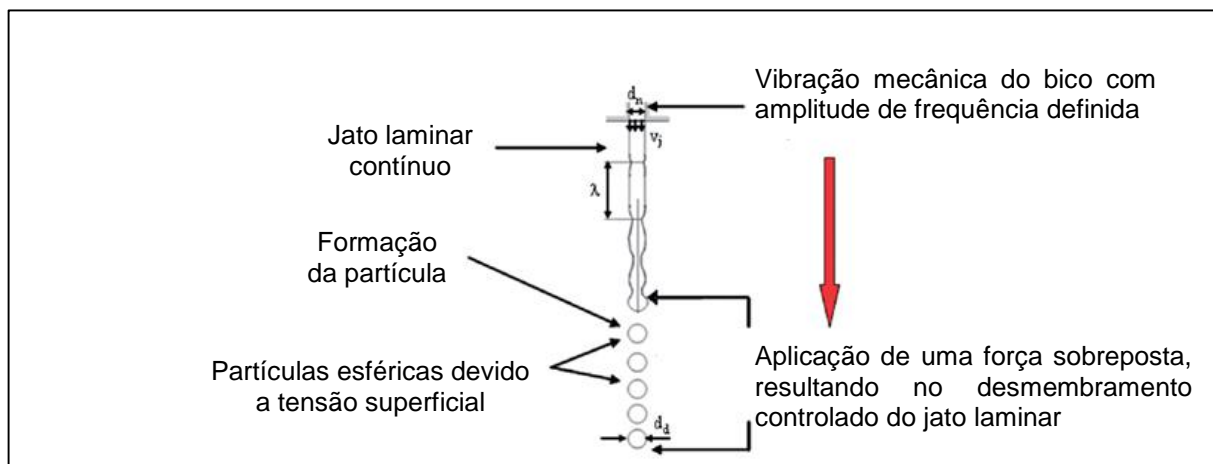


Fonte: Adaptado de Burgain et al. (2011).

### 3.3.1.1 Extrusão por tecnologia de vibração

A tecnologia de vibração baseia-se no princípio da ruptura de um escoamento laminar líquido, por uma frequência de vibração com amplitude definida sobreposta, formando pequenas gotículas (COGHETTO; BRINQUES; AYUB, 2016b) (Figura 3).

Figura 3. Formação de esferas através da extrusão por tecnologia de vibração



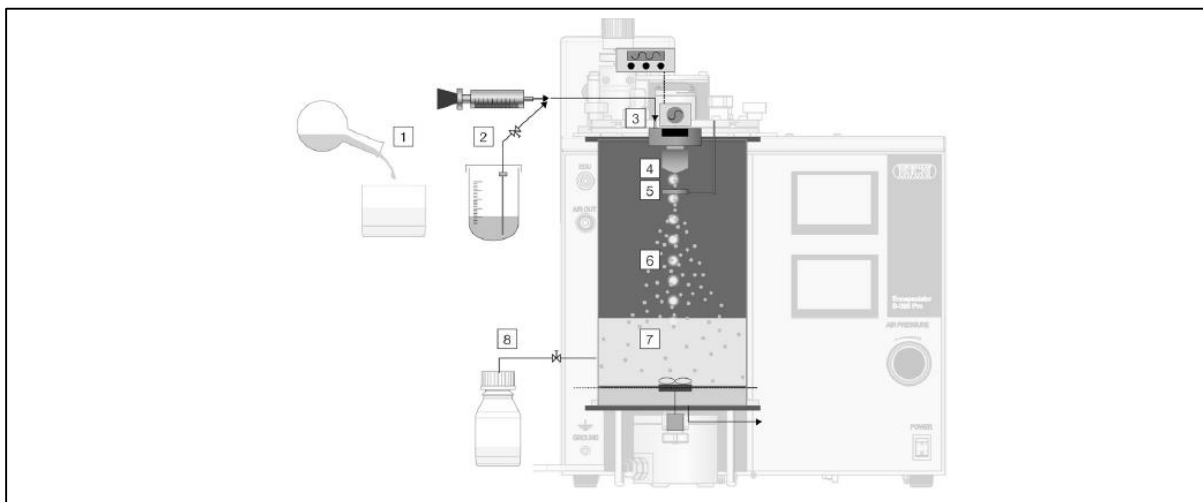
Fonte: Adaptado de Wheleham e Marison (2011).

Quando um líquido é extrusado através de um bico a um determinado escoamento, produzindo um jato laminar, este pode romper-se livremente em comprimentos curtos por perturbações irregulares naturais. Estes segmentos, em seguida, formam gotas esféricas, devido à força de tensão superficial. Essas gotículas então caem sobre uma solução de solidificação, promovendo a formação da cápsula. Uma das formas de promover a solidificação das cápsulas é através da gelificação iônica com o uso do polímero alginato de sódio (material encapsulante) e cloreto de cálcio (agente de solidificação). Neste caso, o cálcio difunde-se para o interior das gotículas do alginato, formando complexos polieletrólitos devido as cargas opostas dessas macromoléculas. As ligações cruzadas resultantes das interações eletrostáticas entre os íons tornam a estrutura da cápsula mais rígida, levando a formação do encapsulado (WHELEHAM; MARISON, 2011).

Esta técnica permite a produção de microesferas uniformes, monodispersas, com tamanhos definidos. As características das esferas formadas são dependentes do diâmetro do bico, da velocidade de escoamento do jato laminar, da amplitude da frequência e da viscosidade do líquido extrusado. Além disso, este método não afeta a viabilidade celular, sendo ideal na aplicação em microrganismos (NEMETHOVA; LACIK; RAZGA, 2014; WHELEHAM; MARISON, 2011). Porém, apesar de resultados promissores, tem se demonstrado de difícil aplicação em larga-escala (COGHETTO; BRINQUES; AYUB, 2016b).

Um dos equipamentos disponíveis comercialmente, que produz esferas através da extrusão por tecnologia de vibração, é o Encapsulator B-395 Pro® (Büchi Labortechnik, Switzerland). Este equipamento permite o encapsulamento de células e microrganismos em condições estéreis com diversos polímeros convencionais, como alginato, gomas, proteína e celulose. Um esquema do funcionamento do Encapsulator B-395 Pro® está demonstrado na Figura 4.

Figura 4. Etapas do encapsulamento através da extrusão por tecnologia de vibração



Fonte: BÜCHI –Encapsulador B-395 Pro (BÜCHI – Ficha técnica Encapsulador B-395 Pro).

As etapas de seu funcionamento incluem:

- (1) Mistura do microrganismo e do material encapsulante;
- (2) Injeção da mistura no sistema (por seringa ou ar comprimido);
- (3) Vibração aplicada sobre o jato laminar;
- (4) Formação das partículas;
- (5) Fase de dispersão eletrostática para evitar a aglomeração das partículas;
- (6) Controle da formação das partículas por lâmpada estroboscópica;
- (7) Polimerização (solidificação) das partículas;
- (8) Coleta dos encapsulados.

Poucos trabalhos na literatura descrevem o encapsulamento por tecnologia de vibração, porém todos indicam a aplicabilidade para células bacterianas e a melhora nas condições do encapsulado. Entre estas melhorias, pode-se destacar a produção de cápsulas com forma padronizada, diminuição do tamanho da partícula em relação a outros métodos e a proteção ao TGI (DEL GAUDIO et al., 2005; MARTONI et al., 2008; MAZZITELLI et al., 2008).

De Prisco et al. (2015) encapsularam o probiótico *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 através da extrusão por tecnologia de vibração, utilizando alginato e quitosana e estudaram a tolerância das cápsulas às condições adversas. Os autores observaram que o processo não afetou a viabilidade celular, obtendo um elevado rendimento no encapsulamento (97%). Ainda, as cápsulas apresentaram um diâmetro

médio de  $110 \pm 5 \mu\text{m}$ , valor adequado para aplicação em produtos alimentícios. O processo melhorou a resistência dos microrganismos às condições do TGI (pH 2,5; 0,5% de sais biliares), além de manterem-se estáveis ao armazenamento (28 dias em diferentes soluções salinas, a  $4^\circ\text{C}$ ).

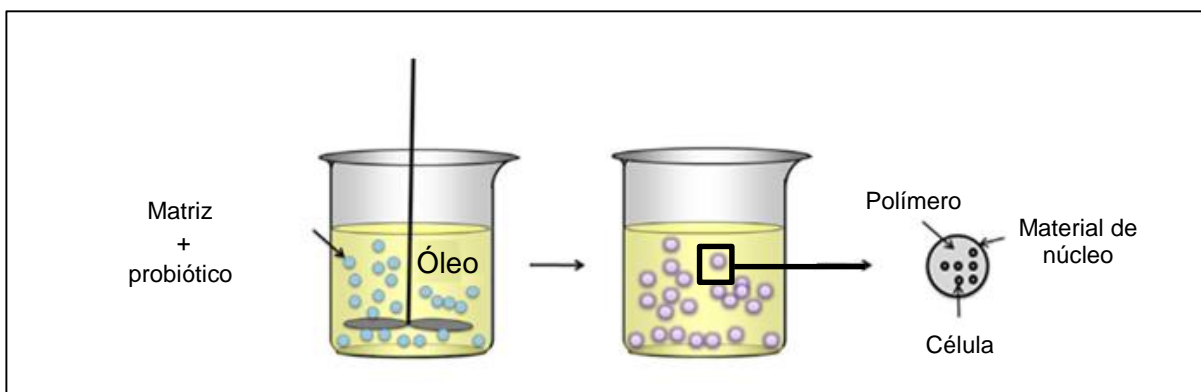
Martoni et al. (2008) encapsularam *L. reuteri* e relataram a proteção das células encapsuladas quando expostas a condições adversas do TGI simulado (pH 2; 0,5% de sais biliares).

Ainda, Shi et al. (2013) encapsularam *L. bulgaricus* em microesferas de alginato-leite. O encapsulamento não afetou a viabilidade da bactéria, obtendo 100% de rendimento do processo. Quando expostas ao TGI (pHs 2 e 2,5; 1 e 2% de sais biliares), as células foram protegidas, sendo efetiva a barreira formada pela cápsula.

### 3.3.1.2 Emulsificação

O princípio desta técnica é baseada na formação de emulsão entre uma fase contínua (geralmente um óleo vegetal) e uma fase descontínua (solução com células vivas e um hidrocolóide), além da adição de um agente emulsionante ou tensoativo (BURGAIN et al., 2011; MARTÍN et al., 2015), como demonstrado na Figura 5.

Figura 5. Processo de encapsulamento por emulsão



Fonte: Adaptado de Burgain et al. (2011).

A mistura homogeneizada formará uma emulsão água-óleo e, após, um agente de solidificação é adicionado para a formação das cápsulas. Técnicas de filtração são geralmente utilizadas para separação das cápsulas ao final do processo (MARTÍN et al., 2015).

Este método apresenta como vantagem a facilidade de ampliação da escala e possibilita uma alta taxa de sobrevivência do microrganismo, porém ele proporciona uma gama de tamanhos (geralmente entre 25 µm a 2 mm) e forma de cápsulas (KENT; DOHERTY, 2014; MARTÍN et al., 2015). A concentração e a viscosidade da solução do encapsulamento, antes da adição do agente de solidificação, a velocidade de agitação e o tipo de emulsificante utilizado são os principais parâmetros que controlam o diâmetro final das cápsulas formadas (IRAVANI; KORBOKANDI; MIRMOHAMMADI, 2014).

#### **3.3.1.3 Liofilização (*Freeze drying*)**

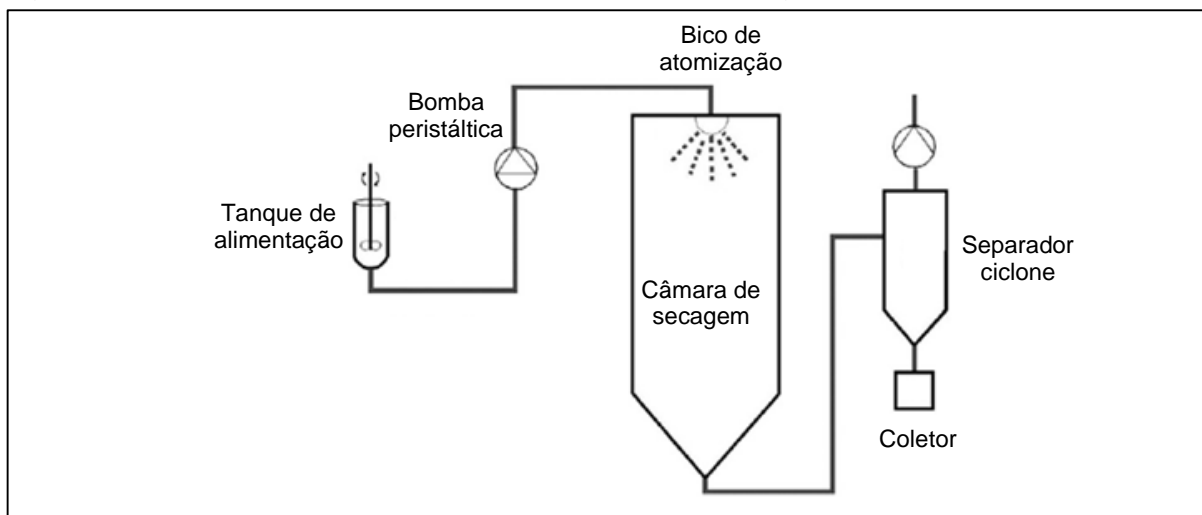
Nesse processo as células são inicialmente congeladas, e através da aplicação de vácuo e baixas temperaturas ocorre o processo de sublimação, havendo a passagem da água do estado líquido diretamente para o gasoso, secando o material. Essa técnica é mais branda em relação a viabilidade dos microrganismos encapsulados quando comparada a técnicas que utilizam calor. Porém, o congelamento pode causar dano à membrana das células pela formação de cristais, além de causar condições de estresse por osmolaridade. Protetores podem ser adicionados previamente ao processo de liofilização para contornar essa condição, como crio protetores (MARTÍN et al., 2015). Como desvantagem, esta é uma técnica de elevado custo quando comparada a outras técnicas de secagem, pela alta demanda de energia envolvida no seu processamento (BURGAIN et al., 2011).

#### **3.3.1.4 *Spray drying***

Entre os métodos de secagem mais utilizados na indústria de alimentos e proposto para a fabricação de encapsulados, a secagem por *spray drying* é a técnica mais utilizada para a formação de cápsulas secas que requerem a formação controlada de pequenas partículas (SU et al., 2007; DE VOS et al., 2010; IRAVANI; KORBOKANDI; MIRMOHAMMADI, 2014). Neste método as células são dissolvidas em uma matriz polimérica (geralmente um hidrocolóide), que tende a formar micropartículas esféricas durante o processo de secagem. Esta solução é pressurizada e atomizada, formando uma "névoa" no interior da câmara de secagem. Junto a isto, um ar quente é injetado na câmara, permitindo a evaporação do solvente.

As cápsulas são, em seguida, transportadas para um separador tipo ciclone e são, finalmente, recuperadas (BURGAIN et al., 2011; MARTÍN et al., 2015; COGHETTO; BRINQUES; AYUB, 2016b). Esse processo pode ser visualizado na Figura 6.

Figura 6. Processo de encapsulamento por *spray drying*



Fonte: Adaptado de Martín et al. (2015).

A secagem por *spray drying* é um processo rápido e de baixo custo quando comparado com outras técnicas, como a liofilização. Além disso, é altamente reprodutível e adequado para aplicações industriais e permite operação em modo contínuo. Porém, a exposição das células à alta temperatura na câmara de secagem, necessária para facilitar a evaporação de água durante sua passagem, pode apresentar um impacto negativo em relação à sua viabilidade e, conseqüentemente, sua atividade biológica. O uso de temperaturas mais amenas, além de protetores térmicos, podem ser aplicados, melhorando assim as condições de sobrevivência do microrganismo (DE VOS et al., 2010; BURGAIN et al., 2011; MARTÍN et al., 2015).

Diversos estudos comparam a influência de diferentes materiais para o encapsulamento por *spray drying*, visando minimizar o efeito causado pelas elevadas temperaturas aplicadas. Os resultados demonstram que a escolha do material encapsulante empregado pode apresentar um efeito protetor contra o aquecimento, levando ao aumento da taxa de sobrevivência dos probióticos encapsulados, quando comparados ao microrganismos livres expostos às mesmas condições (DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012; MACIEL et al., 2014; SOUKOULIS et al., 2014; ARSLAN et al., 2015; ILHA et al., 2015).



Jantzen, Göpel e Beermann (2013) microencapsularam *Lactobacillus reuteri* com soro de queijo por *spray drying* e aplicaram temperaturas de  $90 \pm 1$  °C e  $100 \pm 1$  °C para secagem. Após o processo, foi observada uma redução de 1,8 log UFC.g<sup>-1</sup> sobre a viabilidade da cepa, independente da temperatura utilizada. Os autores sugerem que os constituintes presentes no material de parede foram relevantes para manter a elevada taxa de bactérias viáveis ( $> 9$  log UFC.g<sup>-1</sup>) após o encapsulamento por *spray drying*.

Lavari et al. (2015) utilizaram permeado de soro no crescimento de *Lactobacillus rhamnosus* 64, e soro de queijo em uma combinação de goma arábica, ou maltodextrina, ou amido, ou soro concentrado para o encapsulamento com *spray drying*. Nesse caso, a combinação de soro de queijo e amido apresentou o maior efeito protetor em relação a temperatura de 140 °C aplicada na secagem, com redução de 0,5 log UFC.g<sup>-1</sup>. Mais uma vez, a capacidade de sobrevivência dos microrganismos encapsulados foi atribuída à escolha do material encapsulante utilizado.

Da mesma forma, Hugo, Bruno e Golowczyc (2016) utilizaram permeado de soro como meio de crescimento de *L. plantarum* CIDCA 83114, seguido da secagem por *spray drying* a 170 °C, com e sem a adição de galacto-oligossacidos (GOS). Os autores não encontraram diferença na viabilidade celular ( $>8$  log UFC.g<sup>-1</sup>) na adição de GOS. Além disso, uma pequena redução de  $\approx 0,5$  log UFC.g<sup>-1</sup> foi obtida após o processo, demonstrando que o material encapsulante aplicado é adequado na proteção para as células bacterianas a elevada temperatura.

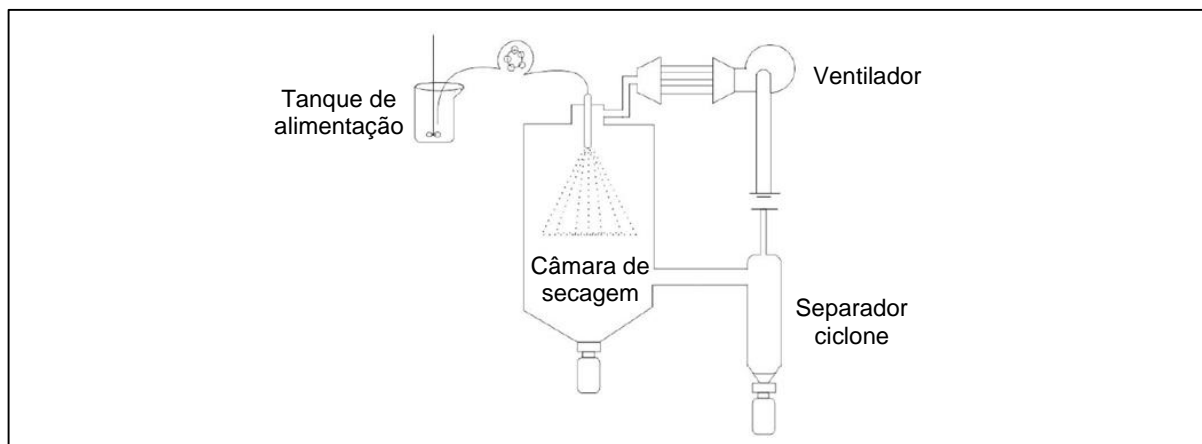
Esses estudos indicam que, mesmo com a aplicação de temperaturas mais elevadas, se combinado com um adequado material encapsulante, a técnica de *spray drying* pode ser aplicada no encapsulamento de microrganismos mantendo sua viabilidade celular em elevadas quantidades.

#### **3.3.1.5 *Spray freeze drying***

O método de *spray freeze drying* (também chamado de *spray cooling* e *spray congealing*) combina passos que são comuns ao *spray drying* e a liofilização. As células vivas, dissolvidas em uma solução polimérica, são atomizadas em uma fase de vapor frio de um líquido criogênico produzindo uma dispersão de gotículas congeladas. Essas são secas por meio da sublimação do solvente e conduzidas para

um separador tipo ciclone, para recuperação ao final do processo (Figura 7) (OKURO; MATOS; FAVARO-TRINDADE, 2013; COGHETTO; BRINQUES; AYUB, 2016b).

Figura 7. Processo de encapsulamento por *spray freeze drying*



Fonte: Adaptado de Okuro, Matos e Favaro-Trindade (2013).

Esta técnica permite a produção de partículas com tamanho controlado. Também podem ser revestidas de um invólucro adicional para aumentar a proteção contra efeitos adversos. No entanto, necessita do uso de alta energia, longo tempo de processamento e alto custo, chegando a ser 30-50 vezes mais cara do que o *spray drying* (BURGAIN et al., 2011; MARTÍN et al., 2015).

### 3.3.2 Tipos de materiais encapsulantes

Os materiais comumente utilizados no encapsulamento de bactérias probióticas incluem polissacarídeos oriundos de algas marinhas (como carragena, alginato), plantas (amido e seus derivados) e frutas (pectina), produtos resultantes do metabolismo de bactérias (gomos gelana e xantana) e também proteínas animais (proteínas do leite, gelatina). A seleção do material vai depender tanto das propriedades funcionais da matriz, quanto da técnica utilizada para o encapsulamento (ANAL; SINGH, 2007; MARTÍN et al., 2015; BURGAIN et al., 2011).

A carragena é composta por repetidas unidades D-galactose-4-sulfato e 3,6-anidro-D-galactose unidos por ligações glicosídicas alternadas. Sua gelificação é dependente da temperatura (40 - 50 °C) e as cápsulas são formadas após a adição de um agente de solidificação na mistura das células e polímero (ANAL; SINGH, 2007; ROKKA; RANTAMÄKI, 2010). As cápsulas de carragena mantêm os microrganismos

em um estado viável, mas os géis produzidos são frágeis e não resistem a tensões. Para contornar essa limitação é possível combiná-la com outros polímeros, produzindo microcápsulas mais estáveis e flexíveis (VIVEK, 2013).

Tee et al. (2013) encapsularam o probiótico *L. plantarum* utilizando carragena como material de parede, através de três técnicas (emulsão, liofilização e extrusão). Em relação a eficiência dos processos de encapsulamento, liofilização ( $89,48 \pm 3,2\%$ ) e a extrusão ( $92,26 \pm 1,4\%$ ) não apresentaram diferenças significativas entre si, porém obtiveram melhores resultados quando comparados a emulsão ( $82,19 \pm 0,71\%$ ).

O alginato (ácido D-manurônico e L-gulurônico) é o biopolímero mais utilizado no encapsulamento de probióticos, devido a características como baixo custo e facilidade de utilização por ser seguro para o uso com alimentos. Além disso, estudos demonstram o efeito protetor do alginato sobre a viabilidade de probióticos em condições adversas (GARCÍA-CEJA et al., 2015). Porém, suas cápsulas apresentam-se muito porosas, causando uma rápida difusão da matriz, reduzindo a barreira contra condições desfavoráveis. Este material pode ser combinado com outros compostos demonstrando melhores resultados na incorporação e armazenamento de alimentos, assim como na sobrevivência durante a passagem ao TGI (MARTÍN et al., 2015).

Alves et al. (2015) avaliaram a sobrevivência de *L. plantarum* LP33 livre e encapsulado com alginato de sódio, incorporado em uma matriz alimentar (pasta de azeitona), nas temperaturas de 20 e 4 °C, durante 30 dias. Observaram uma redução mais acentuada ao armazenamento na temperatura de 20 °C, com reduções de  $\approx 2$  log para o *L. plantarum* LP33 encapsulado e 4 log para o microrganismo livre. Quando comparada ao armazenamento refrigerado (4 °C), as células mantiveram-se estáveis por todo o período de armazenamento. O estudo sugere que o encapsulamento com alginato auxilia na preservação das células durante o armazenamento, quando incorporado a uma matriz alimentar.

As pectinas são extraídas industrialmente a partir de bagaço de maçã e casca de citrus, apresentando normalmente elevado grau de esterificação ( $> 50\%$ ). Comumente são utilizadas para aumentar a viscosidade e força de gel de produtos alimentares. A pectina pode ser adicionada com o alginato no encapsulamento, reforçando o gel e consequentemente seu efeito protetor. Além disso, contribui no consumo de fibra dietética e aprimora o valor nutricional das cápsulas (SANDOVAL-

CASTILLA et al., 2010; BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2015; ZHANG; LIN; ZHONG, 2016).

O amido é um polissacarídeo composto por unidades de  $\alpha$ -D-glicose unidos por ligações glicosídicas (BURGAIN et al., 2011). O amido resistente é aquele que não é digerido por enzimas pancreáticas (amilases) ao longo do intestino delgado, podendo ser utilizado como material encapsulante para garantir a viabilidade dos probióticos desde a ingestão do alimento, até atingir o cólon. Além disto oferece uma ótima superfície de aderência no TGI (ANAL; SINGH, 2007). Geralmente o amido é combinado com outros compostos para servir de material encapsulante, como soro de queijo, atenuando o efeito protetor das BALs (LAVARI et al., 2015).

A goma gelana é um polissacarídeo derivado de *Pseudomonas elodea*, constituída por repetidas unidades de quatro monômeros (glicose, ácido glucurônico, glicose e rhamnose). Já a goma xantana é um polissacarídeo derivado de *Xantomonas campestris*, constituído de repetidas unidades de penta sacarídeos (duas unidades de glicose, duas manoses e um ácido glucurônico). A mistura destas gomas também têm sido utilizadas para encapsular células probióticas por apresentar uma alta resistência a condições ácidas da passagem ao TGI (VIVEK, 2013).

Diversos trabalhos utilizam a combinação de polissacarídeos para melhorar as características do encapsulado. O emprego de uma mistura de alginato, goma xantana e quitosana (Al-Xa-Qui) no encapsulamento de *L. plantarum* LAB12 foi descrito por Fareez et al. (2015), visando avaliar a tolerância ao pH e a elevadas temperaturas. O encapsulamento Al-Xa-Qui protegeu as bactérias (95%) incubadas a pH 1,8 por 120 minutos, comparadas às células livres (51%). Além disso, quando expostas a 75 °C, por 30 segundos, e 90 °C, por 5 segundos, os encapsulados apresentaram maiores taxas de sobrevivência (95,5% e 94,1%) quando comparadas as células livres (57,8% e 58,4%), sugerindo que este método foi eficiente na proteção de organismos quando expostos a condições adversas.

As proteínas do leite, principalmente produtos à base de caseína e proteínas do soro, por apresentarem uma estrutura anfifílica, conferem excelentes propriedades de superfície, permitindo a adsorção em interfaces de óleo/água e estabilizando emulsões. Como consequência de sua estrutura, flexibilidade e estado de agregação, que são influenciados por pH, força iônica e temperatura, são muito utilizadas como

agentes emulsionantes, contribuindo para a estabilidade da superfície da cápsula (KEOGH; O'KENNEDY, 1999; LIVNEY et al., 2010).

Diversas abordagens que utilizam proteínas do leite são descritas na literatura (DE-CASTRO-CISLAGHI et al., 2012; DUONGTHINGOC et al., 2013; KENT; DOHERTY, 2014; MACIEL et al., 2014; ARSLAN et al., 2015; KHEM; SMALL; MAY, 2016). Burgain et al. (2013) encapsularam *L. rhamnosus* GG por emulsificação, com proteínas do leite e do soro de queijo, obtendo uma eficiência de encapsulamento de 97%. Além disso, obtiveram partículas em torno de 60 µm de diâmetro, ideal para a incorporação em alimentos. Quando testadas a condições gastrintestinais, os isolados encapsulados apresentaram uma sobrevivência de 99%.

Uma fonte alternativa e de baixo custo para obtenção dessas proteínas são os subprodutos da indústria de laticínios, entre eles destacam-se o soro de queijo e o permeado de soro.

### **3.3.2.1 Soro de queijo**

O Brasil tem grande destaque na produção mundial de leite. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2015 foram produzidos 24,05 bilhões de litros do produto, sendo que destes, 14,5% foram no Rio Grande do Sul (IBGE, 2016). O Vale do Taquari, inserido na região central do estado, é uma das regiões de destaque na produção leiteira, produzindo 321,4 milhões de litros por ano, correspondendo a aproximadamente 8% da produção nacional (EMATER, 2015).

O soro de queijo é o principal subproduto da indústria de laticínios, gerado pela produção do queijo ou da caseína. É um líquido amarelo-esverdeado resultante da precipitação das proteínas do leite. Há dois tipos principais de soro gerados após a coagulação, que classificam-se de acordo com sua acidez, sendo o soro ácido (pH<5), e o soro doce (pH entre 6 e 7) (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013). A sua composição apresenta cerca de 50% dos sólidos totais que constituíam o leite, sendo destes praticamente 100% da lactose (>75% dos sólidos) e 20% das proteínas (SMITHERS, 2008; SMITHERS, 2015).

A quantidade de soro de queijo fabricado é relacionado com os valores de produtividade do queijo, de forma que para produzir 1 kg do produto, 9 kg de soro são

gerados (SISO, 1996). Desta maneira, é considerado um dos maiores poluentes de águas residuais resultante da fabricação de produtos lácteos, não só pela grande quantidade de volume gerado, mas também pela sua elevada carga orgânica (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013).

A poluição causada pelo soro de queijo é muito discutida, porém este subproduto também representa uma excelente fonte de proteínas e peptídeos funcionais, lipídeos, vitaminas, minerais e lactose, possuindo um alto valor nutricional agregado. A aplicação de tecnologias no gerenciamento desse efluente visa recuperar compostos valiosos, tais como proteínas e lactose. Atualmente, os processos de valorização aplicados ao soro de queijo constituem uma opção preferencial para o tratamento desse subproduto (MOLLEA, MARMO E BOSCO, 2013; ILHA et al., 2015). Aproximadamente 50% do soro de queijo produzido em todo o mundo é tratado e incorporado em alimentos e para alimentação animal. Cerca de metade desse montante é usado diretamente na sua forma líquida, 30% em forma de pó de soro de queijo, 15% como a lactose e seus derivados e o restante como concentrados proteicos (MOLLEA, MARMO E BOSCO, 2013). No geral, duas diferentes opções são empregadas na aplicação do soro de queijo: a primeira é baseada na aplicação de tecnologias para recuperar compostos de valor agregado tais como proteínas e lactose; o segundo visa a aplicação de processos de fermentação para a obtenção de produtos de valor acrescentado (MOLLEA, MARMO E BOSCO, 2013).

Diversos trabalhos empregam a utilização do soro de queijo ou seus compostos no encapsulamento de células bacterianas, com resultados promissores na proteção desses microrganismos, resultante da interação destes, com os constituintes presentes nos sub-produtos (DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012; ILHA et al., 2015; PINTO et al., 2015).

Ribeiro et al. (2014) avaliaram a viabilidade de *L. acidophilus* LA-5 encapsulado com pectina e soro de queijo, em comparação ao probiótico livre, inseridos em iogurte. Foi observada uma melhora na sobrevivência dos microrganismos encapsulados (62%), quando comparado ao probiótico livre (10%), além de uma menor pós-acidificação e maior sobrevida ao armazenamento.

Da mesma forma, Ilha et al. (2015) avaliaram a resistência de *Lactobacillus paracasei* ao encapsulamento por *spray drying*, utilizando leite desnatado reconstituído e soro de queijo como agentes encapsulantes. Estes materiais

forneceam proteção contra o processo de secagem, mantendo a viabilidade bacteriana de 9,24 log UFC.g<sup>-1</sup>. Na exposição ao TGI, pHs ácidos apresentaram uma redução de  $\approx 1$  log, quando comparado as células livres (redução de  $\approx 4$  log). Da mesma forma, na presença de sais biliares uma redução de  $\approx 2$  log foi observada, quando comparado ao controle (redução de  $\approx 3$  log).

O uso do soro de queijo como agente encapsulante se torna então uma possibilidade de aplicação para este subproduto, a fim de melhorar a sua utilização, minimizar a quantidade descartada como resíduo e ainda contribuir no desenvolvimento de novos produtos alimentícios (PIMENTEL-GONZÁLEZ et al., 2009; JANTZEN et al., 2013; MACIEL et al., 2014; SCHELL; BEERMANN, 2014).

### **3.3.2.2 Permeado de soro**

O soro de queijo oriundo da produção do queijo ou da caseína pode ser submetido a um processo de ultrafiltração, para recuperação principalmente das proteínas que são utilizadas no desenvolvimento de produtos com alto valor agregado. Deste processo resulta o permeado de soro, sendo constituído principalmente por lactose e sais. O permeado apresenta múltiplas aplicações, tais como uso em produtos de panificação, misturas de especiarias, salgadinhos, misturas para bebidas, entre outros. Além disso, devido ao seu alto teor de lactose, tem sido utilizado como substrato que permite o crescimento de microrganismos probióticos. Neste caso, o meio de crescimento tem a vantagem de ser mais econômico do que o comercial. Porém muitas vezes é insuficiente para obter uma biomassa adequada de microrganismos e é geralmente suplementada com outros compostos, tais como extrato de levedura e vitaminas (HUGO; BRUNO; GOLOWCZYC, 2016). Novas tecnologias têm sido desenvolvidas (usando nanofiltração ou osmose reversa) para a concentração da lactose do permeado, visando sua aplicação na indústria alimentícia ou em procedimentos de fermentação farmacêutica. Além disso, o permeado de soro é uma fonte atraente de oligossacarídeos para aplicação potencial na nutrição humana (MOLLEA; MARMO; BOSCO, 2013).

Uma aplicação que vem sendo descrita para o permeado de soro é o encapsulamento. Hugo, Bruno E Golowczyc (2016) utilizaram permeado de soro como meio de crescimento de *L. plantarum* CIDCA 83114, seguido da secagem por *spray drying* com ou sem a adição de galacto-oligossacarídeos (GOS) Seus estudos

demostraram que este material encapsulante, mesmo isolado, é adequado na proteção do microrganismo ao processo de secagem, mantendo a viabilidade celular acima de 8 log UFC.g<sup>-1</sup>. Da mesma forma, Lavari et al. (2015) aplicaram permeado de soro no crescimento de *L. rhamnosus* 64, e soro de queijo em uma combinação de compostos (goma arábica/maltodextrina/amido/soro concentrado) para o encapsulamento por *spray drying*. A sobrevivência dos microrganismos encapsulados foi atribuída à combinação dos diferentes material encapsulantes aplicados com os soros lácteos.

Múltiplas possibilidades estão disponíveis para valorização do soro de queijo, entretanto o permeado de soro é menos explorado. Neste sentido, a busca de diferentes aplicações para esse subproduto se torna essencial, de forma a minimizar cada vez mais o impacto gerado e fornecer uma finalidade para um composto com propriedades valiosas.

### **3.3.2.3 Retentado de soro**

Uma das formas de aproveitamento do soro é por meio do processo de nanofiltração. Nesta tecnologia ocorre a retirada principalmente da água, sendo retidos e concentrados todos os componentes do soro. Esse subproduto é denominado retentado de soro (PINTO et al., 2015). Os avanços na tecnologia de processamento do retentado de soro resultaram no desenvolvimento de produtos com alto valor agregado, como os concentrados proteicos (*whey protein concentrate* - WPC) e isolados proteicos (*whey protein isolate* - WPI). Porém esses produtos demandam um alto custo de produção, pois empregam tecnologias na concentração, principalmente, das proteínas contidas no soro (30 – 90 %), e quantidades reduzidas de lactose, gordura e sais (MOLLEA; MARMO; BOSCO, 2013).

Poucos trabalhos utilizam o retentado como material de parede no encapsulamento de probióticos, porém todos demonstram uma aplicação com potencial para esse fim. Entre eles, Pinto et al. (2015) encapsularam *Bifidobacterium BB-12* por *spray drying* com soro retentado numa combinação com galactoligossacarídeos (GOS). Ambos, retentado ou combinado com GOS, mostraram-se apropriados na proteção de probióticos, mantendo uma alta viabilidade celular ao processo (acima de 8 log UFC.g<sup>-1</sup>). Pimentel-González et al. (2009) encapsularam *L. rhamnosus* por

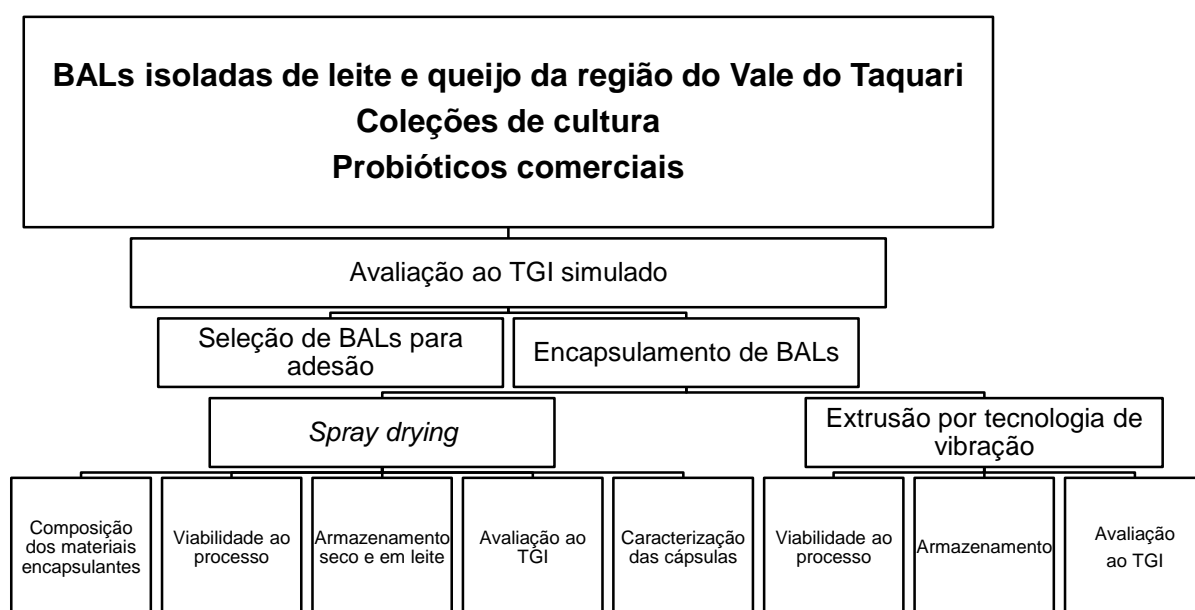


emulsão utilizando soro retentado como material de parede. Este, além de contribuir na estabilização da emulsão formada, protegeu as células a condições adversas, como baixos níveis de pH e presença de sais biliares do TGI. Esses trabalhos indicam que o retentado de soro é um material adequado na proteção de microrganismos, além de apresentar ótimas condições de estabilização de emulsões. Desta forma, torna-se uma alternativa promissora visando o encapsulamento de probióticos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A realização deste trabalho foi desenvolvida em diferentes etapas. Estas envolveram o estudo da resistência de microrganismos isolados às condições ambientais do TGI simulado, seguido da avaliação do potencial de adesão de isolados selecionados e encapsulamento por *spray drying* e extrusão por tecnologia de vibração. Essas etapas estão descritas na Figura 8.

Figura 8. Fluxograma geral do trabalho.



## 4.1 Material

Todos os reagentes e meios de cultura utilizados foram adquiridos da Merck (KGaA, Darmstadt, Alemanha) ou Sigma-Aldrich Co. Ltd. (St. Louis, MO, EUA). Alginato de sódio e pectina de grau alimentício foram adquiridos da Hexus Foods Ingredients (Portão, RS, Brasil).

Soro de leite, permeado de soro e retentado de soro *in natura* foram gentilmente doados por laticínios da região.

## 4.2 Avaliação da sobrevivência de BALs ao trato gastrintestinal simulado

### 4.2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Os microrganismos avaliados estão listados na Tabela 1. Foram utilizadas 109 bactérias isoladas de leite *in natura* e queijo colonial artesanal, fornecidas pela empresa Launer Química Indústria Ltda. Como microrganismos indicadores foram utilizadas as cepas de coleções de cultura *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863, *Lactobacillus paracasei* CCT 6488, *Lactobacillus delbrueckii* CCT 1644, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Além de dois probióticos comerciais, *Lactobacillus acidophilus* (Danisco-Howaru) e *Bifidobacterium lactis* (Danisco-Howaru). As bactérias foram incubadas em caldo MRS (peptona de caseína 10 g.L<sup>-1</sup>, extrato de carne 8 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 4 g.L<sup>-1</sup>, glicose 20 g.L<sup>-1</sup>, hidrogenofosfato dipotássico 2 g.L<sup>-1</sup>, hidrogenocitrato diamônico 2 g.L<sup>-1</sup>, acetato de sódio 5 g.L<sup>-1</sup>, sulfato de magnésio 0,2 g.L<sup>-1</sup>, sulfato de manganês 0,04 g.L<sup>-1</sup>, Tween 80® 1 g.L<sup>-1</sup>), por 48 horas a 32 °C sem agitação. A contagem final de microrganismos foi determinada de acordo com o número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL<sup>-1</sup>).

Tabela 1. Microrganismos avaliados quanto às condições ambientais do TGI simulado

Isolado			
<i>L. paracasei</i> CCT 6488*	ML28	ML57	CH107
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014*	ML29b	ML58	CH108
<i>L. rhamnosus</i> ATCC* 10863	ML29p	ML59	CH109
<i>L. casei</i> ATCC 393*	ML30	ML60	CH112
<i>L. delbrueckii</i> CCT 1644*	ML31	ML61	CH113
<i>L. acidophilus</i> **	ML32	ML62	CH114
<i>B. lactis</i> **	ML33	ML64	CH115
ML1	ML34	ML65b	CH116
ML2	ML36	ML66	CH117
ML4	ML37	ML67	CH118
ML5	ML38	ML69	CH119
ML6	ML39	ML70	CH120
ML7	ML40	ML71	CH121
ML8	ML41	ML73	CH123
ML10	ML42	ML74	CH124
ML11	ML43	ML75B	CH129
ML12	ML44	ML75C1	CH130
ML15	ML46	ML75C2	CH131
ML17	ML47	ML76	CH132
ML18	ML47a	ML78a	CH133
ML19	ML47b	ML78b	CH134
ML20	ML48	ML80	CH135
ML21	ML50	ML82	CH136
ML22	ML50a	ML88a	CH137
ML23	ML50b	ML89	CH140
ML24	ML51	ML99	CH141
ML25	ML55	ML103	
ML26	ML56	CH104	

\*Coleções de cultura; \*\*Probióticos comerciais; ML: isolado de leite; CH: isolado de queijo.

#### 4.2.2 Sobrevivência ao trato gastrointestinal simulado

A avaliação da sobrevivência dos isolados ao TGI simulado foi realizado de acordo com Meira et al. (2012). As culturas previamente inoculadas e padronizadas foram centrifugadas a 2370xg por 15 minutos a 4 °C, lavadas duas vezes com tampão fosfato (10 mM pH 7,0) e ressuspensas em solução de 0,5% (m/v) de NaCl. Para o

ensaio da sobrevivência, uma alíquota de 0,2 mL dos isolados foram expostos na presença de 1,0 mL de suco gástrico e intestinal simulado. Suco gástrico simulado foi preparado contendo 3,0 mg.mL<sup>-1</sup> de pepsina de mucosa gástrica de suíno, 0,5% (m/v) de NaCl ajustados a pH 2,0, 2,5 e 3,0. Suco intestinal simulado foi preparado contendo 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> de pancreatina, 0,5% (m/v) de NaCl ajustado a pH 8,0, sem e com 5,0 g.L<sup>-1</sup> de uma mistura 1: 1 de colato de sódio e deoxicolato de sódio. Após, ambas as soluções foram esterilizadas por filtração com membranas de 0,22 µm (Sartorius Stedim Biotech, GmbH, Goettingen, Alemanha). As contagens de células viáveis foram determinadas no momento inicial (zero) e após 3 h para sobrevivência ao trato gástrico simulado e 4 h para sobrevivência ao trato intestinal simulado.

#### 4.2.3 Determinação de células viáveis

A contagem de células viáveis foi realizada por diluição seriada dos tratamentos em peptona bacteriológica 0,1%. A verificação da viabilidade foi realizada por técnica de *drop plate* em agar MRS, incubadas a 32 °C por 48 horas.

A taxa de sobrevivência de cada condição foi calculada de acordo com Bao et al. (2010), através da Equação 1:

$$\text{Taxa de sobrevivência (\%)} = \frac{\log \text{UFC } N_1}{\log \text{UFC } N_0} \times 100\% \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

N<sub>1</sub>: contagem de células viáveis após às condições ambientais do TGI;

N<sub>0</sub>: contagem de células viáveis anteriormente às condições ambientais do TGI.

#### 4.3 Curvas de crescimento

Os microrganismos *L. parabuchneri* ML04, *L. paracasei* ML13, *L. paracasei* ML24, *L. paracasei* ML33, *L. pentosus* ML82, *Enterococcus faecalis* CH121, *L. plantarum* CH131, *L. paracasei* CH135 e *L. paracasei* CH139, *Lactobacillus acidophilus* (Danisco-Howaru) e *Lactobacillus plantarum* ATCC foram selecionados de acordo com a sobrevivência às condições ambientais do TGI para realização de curvas de crescimento. A construção das curvas teve como objetivo relacionar a

densidade ótica (D.O.) com o número de células viáveis (UFC.mL<sup>-1</sup>). Os isolados previamente armazenados em glicerol a -20 °C foram pré-inoculados em meio MRS e incubados por 48 h a 32 °C sem agitação. Destes, placas contendo ágar MRS foram estriadas por esgotamento para obtenção de culturas puras. Após o crescimento, uma colônia isolada foi reinoculada em meio MRS líquido, e novamente incubada por 48 h a 32 °C. Os inóculos foram então padronizados e uma alíquota de 5% foi adicionada em frascos contendo caldo MRS e avaliadas quanto ao crescimento por 3, 6, 9, 15, 24, 29, 33 e 48 horas, até terem atingido a fase estacionária. Ainda, em cada ponto foram retiradas alíquotas para a determinação da D.O. a 600 nm em espectrofotômetro (UV-2600, Shimadzu, Kyoto 604-8511, Japan).

#### **4.4 Capacidade de adesão de BAL em linhagem de Caco-2**

##### **4.4.1 Microrganismos e condições de cultivo**

Os isolados bacterianos *L. parabuchneri* ML04, *L. paracasei* ML13, *L. paracasei* ML24, *L. paracasei* ML33, *L. pentosus* ML82, *Enterococcus faecalis* CH121, *L. plantarum* CH131, *L. paracasei* CH135 e *L. paracasei* CH139 foram selecionados de acordo com a sobrevivência às condições ambientais do TGI para realização do ensaio de adesão em Caco-2. Ainda, *Lactobacillus acidophilus* (Danisco-Howaru) e *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 foram utilizados como controle positivo. Todas as culturas foram mantidas em estoque a -20 °C em glicerol a 25%. As bactérias foram incubadas em caldo (MRS) por 48 horas a 32 °C. A contagem final de microrganismos foi padronizada e determinada de acordo com o número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL<sup>-1</sup>).

##### **4.4.2 Cultura da linhagem celular de Caco-2**

As células de adenocarcinoma de cólon humano Caco-2 foram incubadas em meio Eagle modificado por Dulbecco Low Glucose (DMEM-LG), suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina, 1% de aminoácidos não essenciais e bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>). Células Caco-2 foram transferidas (2x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup>) para placas de 12 poços, contendo ao fundo, uma lamínula de

vidro de 13 mm de espessura. A linhagem celular foi mantida em atmosfera úmida (UR) a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> até atingir formação de monocamada (70 a 80% de confluência) e foram utilizadas pós-confluência com 15 dias de cultura.

#### **4.4.3 Ensaio de adesão de BALs em Caco-2**

A capacidade de adesão de BALs ao epitélio intestinal foi realizada de acordo com Cravioto et al. (1979) e Gopal et al. (2001), com modificações. Caco-2 foram lavadas por uma vez com tampão fosfato (pH 7,4) estéril. Em cada poço da placa de cultivo foi adicionado 1 mL de meio DMEM-LG completo isento de antibióticos, contendo cada um dos isolados descritos no item 4.4.1 ( $1 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Ainda, um poço isento de microrganismo foi utilizado como controle. As placas foram incubadas por 3 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% v/v de CO<sub>2</sub>, e após este período, cada poço foi lavado três vezes com tampão PBS pH 7,4 estéril. Seguidamente, as células foram fixadas com 1 mL de metanol por 30 minutos e coradas com coloração de Gram. As lamínulas de vidro foram fixadas em lâminas retangulares de vidro e visualizadas em microscópio ótico (CX31 – Olympus Corporation, Tóquio, Japão) com aumento de 1000X. Dez células Caco-2 foram utilizadas para calcular a média do número de BALs aderentes de 4 experimentos independentes. Os resultados dos ensaios de adesão são expressos como “Índice de adesão”, que é definido como o número de células bacterianas aderidas por 100 células epiteliais (nº BALs/100 células Caco-2).

#### **4.5 Encapsulamento de BAL**

A técnica de encapsulamento de bactérias lácticas foi realizada por *spray drying* e extrusão por tecnologia de vibração.

##### **4.5.1 Análise físico-química dos subprodutos da indústria de laticínios**

Soro de leite, permeado de soro e retentado de soro utilizados no processo de microencapsulamento foram analisados em relação aos parâmetros físico-químicos de acordo com a AOAC (2012). Sólidos totais foram avaliados pelo método No. 990,20; teor de gordura pelo método No. 2000,18; proteína foi determinado pelo

método de Kjeldahl, seguindo o procedimento elaborado no método No. 991,20; cinzas pelo método No. 968,08; e teor de carboidratos foi calculada de acordo com o método 986,25.

#### **4.5.2 Microencapsulamento de *L. plantarum* ATCC 8014 por *spray drying***

##### **4.5.2.1 Microrganismos e condições de cultivo**

A cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, mantida a -20 ° C em glicerol a 25% e utilizada neste estudo. Antes da condução dos experimentos, *L. plantarum* foi inoculado em caldo MRS por 48 h a 32 °C sem agitação. A contagem final de microrganismos foi determinada de acordo com o número de unidades formadoras de colônias por g (UFC.g<sup>-1</sup>).

##### **4.5.2.2 Produção de microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 por *spray drying***

Os materiais de parede utilizados para o preparo das soluções de alimentação foram soro de queijo, permeado de soro e retentado de soro. Antes da realização dos experimentos, todas as soluções foram homogeneizadas e tratadas termicamente a 65 °C durante 30 min.

Células bacterianas previamente incubadas foram recolhidas por centrifugação (2.370xg, 10 min a 4 °C), lavadas duas vezes em tampão fosfato (10 µM pH 7,0) e ressuspendidos em cada uma das soluções de alimentação. Estas foram então microencapsuladas utilizando um *spray dryer* de escala de laboratório (Labmaq - MSD 0,5, São Paulo, SP, Brasil), operando a temperatura constante, com ar de entrada de 90 °C e ar de saída de 75 °C. As soluções de alimentação contendo *L. plantarum* foram mantidas sob agitação à temperatura ambiente e injetadas na câmara de secagem através de uma bomba peristáltica, a uma vazão de alimentação de 0,25 L.h<sup>-1</sup> e vazão de ar de 2,5 m<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup>. As amostras secas em pó das microcápsulas de soro de queijo (MS), microcápsulas de permeado (MP) e microcápsulas de retentado de soro (MR) foram recolhidas a partir de separador tipo ciclone e armazenadas em frascos estéreis.



#### 4.5.2.3 Viabilidade das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014

*L. plantarum* foi enumerada para verificação da sua viabilidade por *drop plate* em ágar MRS de acordo com Kim et al. (2008), com modificações. Para determinar a contagem de células viáveis dos encapsulados, 0,1 g de cápsulas foram suspensas em 10 mL de tampão fosfato (100 mM pH 7,4) e agitadas durante 15 min utilizando um agitador magnético, até a liberação completa das bactérias contidas nas microcápsulas. As unidades formadoras de colônia (UFC.g<sup>-1</sup>) foram determinadas por diluições seriadas em placas contendo ágar MRS e incubadas a 32 °C por 48 h. A sobrevivência de *L. plantarum* após o processo de *spray drying* foi realizada de acordo com Pinto et al. (2015), com modificações, e expressos pela redução de log, como descrito na Equação 2:

$$\text{Redução log} = \log N_b - \log N_a \quad (\text{Equação 2})$$

Onde  $N_b$  é o número de células viáveis (log UFC.g<sup>-1</sup>) nas soluções de alimentação antes do processo de secagem por *spray drying*, e  $N_a$  é o número de células viáveis (log UFC.g<sup>-1</sup>), após o processo, nas microcápsulas.

#### 4.5.2.4 Sobrevivência das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 ao armazenamento

Os produtos secos por *spray drying* foram armazenados em frascos estéreis a 20 °C, sob condições que mimetizam o armazenamento normal de prateleira, sem a necessidade de refrigeração. A sobrevivência dos microencapsulados contendo *L. plantarum* ao armazenamento foi determinada diretamente após o processo de *spray drying*, e durante 8 semanas. A amostragem foi realizada em 4, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias, conforme descrito no item 4.5.2.3.

#### **4.5.2.5 Sobrevivência e pH das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 em leite**

*L. plantarum* livre e MS, MP e MR foram incorporadas em leite. 1 g das microcápsulas foram adicionadas a 100 mL de leite integral, homogeneizadas e armazenadas a 4 °C durante 6 semanas. A amostragem foi realizada em 0, 4, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias. Foram avaliadas a viabilidade das células livres e microencapsuladas inseridas em leite retirando 1 mL de cada amostra, através o método descrito no item 4.5.2.3, além da evolução da acidificação pela medição do pH empregando método potenciométrico.

#### **4.5.2.6 Sobrevivência das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 ao trato gastrointestinal simulado**

Amostras de MS, MP e MR armazenadas a 20 °C, assim como inseridas em leite a 4 °C, foram expostas a soluções gastrointestinais simuladas para a determinação da capacidade de sobrevivência de *L. plantarum* em 0 e 28 dias de armazenamento. O ensaio foi realizado de acordo com metodologia proposta por Meira et al. (2012) com algumas modificações. Para MS, MP e MR armazenadas a 20 °C, 0,1 g foram incubadas a 37 °C na presença de 1,0 mL de sucos simulados. Para MS, MP e MR, inseridas em leite e armazenadas a 4 °C, 1,0 mL foi incubado a 37 °C na presença de 1,0 mL de sucos simulados. O preparo dos sucos simulados, assim como a determinação das contagens de células viáveis estão descritos nos itens 4.2.2 e 4.2.3 respectivamente. Ainda, *L. plantarum* livre e *L. plantarum* livre inserida em leite foram expostas em sucos gastrointestinais simulados e utilizadas como controle.

#### **4.5.2.7 Caracterização das microcápsulas**

A caracterização de MS, MP e MR foi realizada imediatamente após o processo de secagem por *spray drying*.

#### **4.5.2.7.1 Morfologia e tamanho de partícula**

As amostras foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (LS 10 - Carl Zeiss, Jena, Alemanha), a uma tensão de aceleração de 20 kV, para verificação da morfologia da superfície das microcápsulas, bem como a estimativa do seu tamanho. Todas as amostras foram fixadas e tratadas por pulverização em uma metalizador (Q 150R ES - Quorum Technologies, East Sussex, Inglaterra) com ouro-paládio e, em seguida, observadas em modo alto vácuo.

#### **4.5.2.7.2 Umidade e atividade de água**

A umidade contida nas microcápsulas foi determinada gravimetricamente por secagem em estufa de acordo com AOAC (2012) Método No. 990,20. A atividade de água foi medida logo após a secagem das amostras utilizando o instrumento para atividade de água Aqualab (Aqualab Lite - Decagon, Pullman, WA 99163, USA). O equipamento foi calibrado com soluções padrão fornecidas pelo fabricante.

#### **4.5.2.7.3 Análise de cor**

A análise de cor foi realizada com colorímetro Konica Minolta CM-5 (Chiyoda, Tóquio, Japão), e a escala  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  foi utilizada para a medição dos parâmetros. O eixo  $L^*$  varia de 0 a 100, indicando a variação de cor de preto para branco. O eixo  $a^*$  indica a variação de vermelho (+) e verde (-). O eixo  $b^*$  indica a variação de amarelo (+) para azul (-).

### **4.5.3 Encapsulamento através da extrusão por tecnologia de vibração**

#### **4.5.3.1 Microrganismos e condições de cultivo**

Os isolados bacterianos utilizados foram *L. paracasei* ML33, *L. pentosus* ML82 e *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, sendo mantidos em estoque a -20 °C em glicerol 25%. Antes da condução do experimento, as bactérias foram incubadas em caldo MRS, por 48 horas a 32 °C sem agitação. A contagem final de microrganismos

foi padronizada e determinada de acordo com o número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL<sup>-1</sup>).

#### **4.5.3.2 Produção de encapsulados através da extrusão por tecnologia de vibração**

O encapsulamento de células bacterianas foi realizado através do Encapsulator B-395 Pro (BÜCHI Labortechnik AG, Meierseggstrasse 40, CH-9320 Flawil 1, Switzerland), equipado com um bico de 80 µm e uma bomba de seringa, de acordo com De Prisco et al. (2015). A seringa utilizada no sistema de alimentação foi carregada com 15 mL de uma mistura 1:1:1 dos materiais encapsulantes com as bactérias previamente inoculadas. Os materiais de parede aplicados foram alginato de Sódio 1,5% (m/v), pectina 1,25% (m/v), além de soro de queijo (SQ) ou permeado de soro (PS). A solução foi injetada a uma taxa de alimentação de 5 mL/min, frequência de vibração de 1740 Hz e tensão de eletrodo de 950 mV. As cápsulas foram solidificadas em 200 mL de uma solução CaCl<sub>2</sub> (0,5 M), sob agitação, durante cerca de 30 minutos. Ao final do encapsulamento, as suspensões contendo as microcápsulas foram recolhidas em frascos estéreis, filtradas, ressuspensas em 100 mL de tampão fosfato (10 mM pH 7,0) e armazenadas a 4 °C. Foram produzidos encapsulados de Al-Pec-SQ (Alginato-Pectina-Soro de Queijo) e Al-Pec-PS (Alginato-Pectina-Permeado de Soro) para cada um dos isolados (*L. paracasei* ML33, *L. pentosus* ML82 e *L. plantarum* ATCC 8014).

#### **4.5.3.3 Viabilidade dos encapsulados à extrusão por tecnologia de vibração**

As bactérias contidas nas microcápsulas foram enumeradas para verificação da viabilidade, por *drop plate* em placas contendo ágar MRS, de acordo com Kim et al. (2008), com modificações. Para determinar a contagem de células viáveis dos encapsulados, 1 mL das cápsulas foram suspensas em 9 mL de tampão de fosfato (100 mM pH 7,4) e agitadas durante 15 min, a 180 RPM em agitador orbital até a liberação completa das bactérias. As unidades formadoras de colônia (UFC.mL<sup>-1</sup>) foram determinadas por diluições seriadas em placas contendo ágar MRS e incubadas a 32 °C por 48 h.

#### **4.5.3.4 Sobrevivência dos encapsulados obtidos através da extrusão por tecnologia de vibração ao armazenamento**

Os encapsulados foram armazenados durante 28 dias a 4 °C e a contagem de células viáveis foi realizada diretamente após o processo de encapsulamento e após 4, 7, 14, 21 e 28 dias, conforme descrito no item 4.5.2.3.

#### **4.5.3.5 Sobrevivência dos encapsulados obtidos através da extrusão por tecnologia de vibração ao trato gastrointestinal simulado**

Amostras dos encapsulados foram expostas a soluções gastrointestinais simuladas para a determinação da capacidade de sobrevivência dos isolados. O ensaio foi realizado de acordo com metodologia proposta por Meira et al. (2012) com algumas modificações. 1,0 mL de cada encapsulado foi incubado a 37 °C na presença de 1,0 mL de sucos simulados. O preparo dos sucos, assim como a determinação das contagens de células viáveis estão descritos nos itens 4.2.2 e 4.2.3 respectivamente. Ainda, amostras não encapsuladas dos isolados *L. paracasei* ML33, *L. pentosus* ML82 e *L. plantarum* ATCC 8014 foram expostas em sucos gastrointestinais simulados e utilizadas como controle.

### **4.6 Análise estatística**

Os resultados das análises de todos os experimentos foram calculados como a média de experimentos independentes. ANOVA e teste-t (Biostat 5.3) foram aplicados para determinar diferenças significativas entre as médias; significância foi declarada para  $p < 0,05$ .

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Avaliação da sobrevivência de BAL ao trato gastrointestinal simulado**

Na seleção de microrganismos probióticos, uma característica essencial é a sobrevivência, da passagem às condições adversas do TGI. O baixo pH do estômago, em conjunto com a atividade proteolítica das enzimas digestivas, é o primeiro e um dos mais importantes desafios a serem superados por um isolado (BURNS et al., 2014). Sendo assim, as BAL isoladas de leite *in natura* e queijo foram inicialmente avaliadas quanto a exposição às condições ambientais do trato gástrico e do trato intestinal simulado. Foram analisados 109 isolados de leite e queijo, além de 5 microrganismos de coleções de cultura e 2 probióticos comerciais (Anexo A). Foi avaliada a taxa de sobrevivência (%) de todos os isolados testados de acordo com o item 4.2.3.

#### **5.1.1 Avaliação ao trato gástrico**

Na avaliação ao trato gástrico, as bactérias foram incubadas em soluções simuladas contendo 3 mg/mL de pepsina, acidificada para pH 2, 2,5 e 3 durante 180 minutos. Nenhum isolado sobreviveu a exposição ao pH 2. Resultado semelhante foi encontrado por Pieniz et al. (2014), que ao avaliarem o potencial probiótico de *Enterococcus durans* LAB18s, constataram que na passagem ao trato gástrico

simulado, embora a cepa tenha apresentado alta tolerância a condições ácidas, para o pH 2, a condição mais extrema, não houve sobrevivência do microrganismo após 180 minutos de incubação. Da mesma forma, Tulumoglu, Kaya e Simsek (2014) não observaram taxa de sobrevivência para *Lactobacillus fermentum* para o mesmo pH. Segundo o autor, o pH baixo do estômago é uma condição severa na sobrevivência do microrganismo. Mas considera-se que o pH do estômago durante a ingestão de alimentos pode aumentar para 4,5, o que melhora a condição de exposição em que a bactéria é inserida.

Na exposição aos pHs 2,5 e 3, houve um aumento da viabilidade das bactérias expostas às condições do trato gástrico, de 80 a 100%, sendo mais evidente com o aumento do pH (Anexo B). A influência do pH é relevante na viabilidade das células, a resistência das bactérias frente a esse parâmetro é dependente tanto da cepa, quanto ao pH considerado (SAITO et al., 2014). Esse fato foi descrito, da mesma forma, por Meira et al. (2012), nos ensaios *in vitro* para tolerância ao TGI de 20 *Lactobacillus* isolados de queijo de ovino. Observaram que a tolerância ácida é específica da cepa, e a sensibilidade dos mesmos é aumentada com valores de pH inferiores a 3. Ressaltam que essa tolerância pode estar relacionada com a diferença da atividade de H<sup>+</sup>-ATPase, proteína que controla a concentração de H<sup>+</sup> intracelular, mantendo assim a homeostase do pH e a viabilidade celular. Além disso, a quantidade e o estado fisiológico da bactéria podem contribuir para a sua sobrevivência, já que os probióticos são principalmente inseridos em produtos lácteos fermentados e, sendo assim, as proteínas do leite podem reforçar a proteção ao microrganismo dando suporte à tolerância ao suco gástrico (DARDIR, 2012; TUO et al., 2013).

### **5.1.2 Avaliação ao trato intestinal**

Na avaliação ao trato intestinal, as bactérias foram incubadas a soluções simuladas contendo 1 mg/mL de pancreatina a pH 8, na ausência e presença de 0,5% de sais biliares (mistura 1:1 de colato de sódio e deoxicolato de sódio), durante 240 minutos. A resistência a sais biliares é considerada uma característica probiótica importante, já que a pancreatina (secreção pancreática que contém enzimas digestivas) é considerada tóxica para a maioria dos microrganismos. Porém, autores relatam que as enzimas digestivas, contendo pepsina e pancreatina, embora

consideradas tóxicas à bactéria, têm pouca influência sobre a tolerância gastrointestinal do probiótico, sendo fatores críticos o baixo pH e a concentração de sais biliares presentes (RANADHEERA et al., 2014).

Este fato pode ser observado nos resultados apresentados (Anexo B), de forma que na grande maioria dos isolados, na presença de pancreatina, a sobrevivência é maior e quase não apresenta diferenças quando comparado ao tempo inicial, com resultados na faixa de 100% de sobrevivência. Porém, quando expostos à presença de sais biliares há uma diminuição em torno de 10% ( $\approx 6 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ ) da viabilidade dos isolados.

Resultado semelhante foi encontrado no estudo do potencial probiótico de *Lactobacillus* isolados de polpa de frutas por Garcia et al. (2016). Os autores avaliaram a tolerância de 5 bactérias ao TGI, sendo expostos a diferentes concentrações de sais biliares (0,15; 0,30; 1,00 %). Foi observado que mesmo nas concentrações mais elevadas de sais, os microrganismos mantiveram-se viáveis, sem apresentar diferença quando comparados a contagem celular inicial ( $\approx 7 \log \text{UFC.g}^{-1}$ ). Em contraste, Ranadheera et al. (2014) avaliaram o potencial de *L. acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *Propionibacterium jensenii* 702 em combinações com culturas fermentadas de leite de cabra. Na exposição ao trato intestinal, na presença de pancreatina e na ausência de sais biliares não observaram diferenças na viabilidade das bactérias. Porém, uma redução significativa ( $> 2$  ciclos log) foi observada na presença de 0,3% de sais biliares. Essa concentração é inferior a utilizada nesse trabalho, e apresentou uma redução semelhante na viabilidade dos isolados.

Para uma cepa ser considerada probiótica, o primeiro passo é a tolerância do microrganismo às condições adversas do TGI, para que possam atingir, aderir e proliferar no intestino, desempenhando as funções benéficas ao hospedeiro. Além disso, é de extrema importância que ela permaneça viável quando incorporada em alimentos até o momento do consumo, sem comprometer os atributos sensoriais (ANVISA, 2008). Portanto, uma seleção adequada de cepas que tolerem o TGI e atinjam o intestino em elevadas quantidades é de extrema importância.

Já é constatado que os probióticos apresentam diversos efeitos benéficos sobre a saúde, sendo assim, a entrada do probiótico no hospedeiro através de uma matriz alimentícia é um dos meios mais adequados para maximizar sua eficácia, além



de minimizar os efeitos prejudiciais causados por ambientes adversos ao qual ele pode ser exposto (RYAN et al., 2008).

Para os posteriores ensaios de adesão e encapsulamento foram selecionadas BALs já identificadas por sequenciamento do rDNA 16S, com sobrevivência acima de 70% (Anexo B) em todas as condições ao qual foram expostos. Exceto para pH 2, onde nenhum microrganismo manteve-se viável após o período de incubação). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Taxa de sobrevivência (%) dos isolados selecionados expostos às condições ambientais do TGI simulado

Isolado	Trato gástrico (%)		Trato intestinal (%)	
	pH 2,5	pH 3	0% sais biliares	0,5% sais biliares
<i>L. parabuchneri</i> ML4	86,57 (1,03)	86,24 (0,84)	99,38 (0,58)	97,43 (0,37)
<i>L. paracasei</i> ML 13	84,93 (1,12)	99,76 (0,39)	100,00 (0,30)	90,52 (2,63)
<i>L. paracasei</i> ML 24	73,65 (1,36)	100,00 (0,83)	99,99 (0,94)	90,88 (1,28)
<i>L. paracasei</i> ML 33	80,96 (0,40)	95,30 (0,20)	94,59 (0,67)	100,00 (1,29)
<i>L. pentosus</i> ML 82	88,30 (1,29)	89,00 (2,06)	98,74 (0,05)	79,60 (0,90)
<i>Enterococcus faecalis</i> CH121	88,03 (0,52)	97,13 (1,76)	100,00 (0,98)	100,00 (0,91)
<i>L. plantarum</i> CH 131	81,42 (1,01)	92,45 (1,04)	91,52 (1,90)	86,18 (0,22)
<i>L. paracasei</i> CH 135	85,53 (0,27)	97,34 (1,15)	100,00 (0,58)	100,00 (0,35)
<i>L. paracasei</i> CH 139	88,81 (0,75)	93,02 (0,74)	100,00 (0,19)	100,00 (0,60)

ML: isolados de leite; CH: isolados de queijo. Média (desvio padrão), n=2.

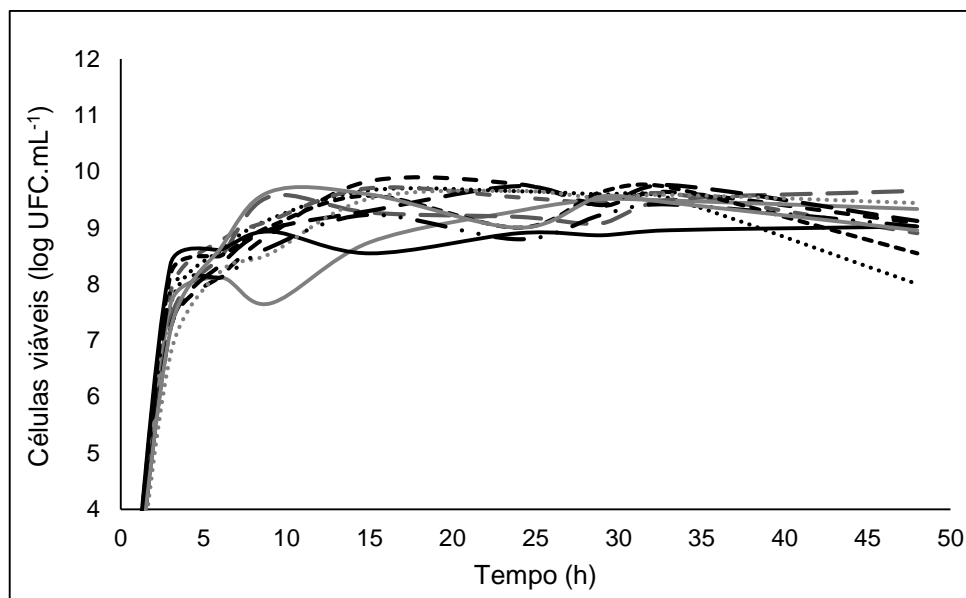
Os isolados selecionados apresentaram viabilidade superior a 70% na exposição ao trato gástrico e 79% ao trato intestinal. Em sua maioria, esses resultados estão acima de 6 log UFC.mL<sup>-1</sup>. A contagem de microrganismos para um produto ser considerado probiótico é estabelecido de acordo com a legislação de cada país,

entretanto, níveis entre  $10^6$  e  $10^9$  UFC/g têm sido sugeridos (FAO/WHO, 2002; ANVISA, 2008), estando os isolados estudados em conformidade com esses valores. Ainda, quando o probiótico é inserido em um alimento, e este ingerido, o nível de pH do estômago pode aumentar, melhorando a condição da exposição do mesmo e consequentemente sua viabilidade (TULUMOĞLU; KAYA; ŞİMŞEK, 2014).

## 5.2 Curvas de crescimento

Células em meio de cultura possuem um padrão de crescimento que pode ser representado através de uma curva de crescimento. Esta reflete as etapas de adaptação das células às condições ambientais, permitindo controlar a fase em que as células serão utilizadas em um experimento (ALVES; GUIMARÃES, 2010). Na Figura 9 estão relacionadas as curvas de crescimento para os isolados *L. parabuchneri* ML04, *L. paracasei* ML13, *L. paracasei* ML24, *L. paracasei* ML33, *L. pentosus* ML82, *Enterococcus faecalis* CH121, *L. plantarum* CH131, *L. paracasei* CH135 e *L. paracasei* CH139 e controles *L. plantarum* ATCC 8014 e *L. acidophilus*.

Figura 9. Curvas de crescimento dos isolados selecionados para os testes de adesão



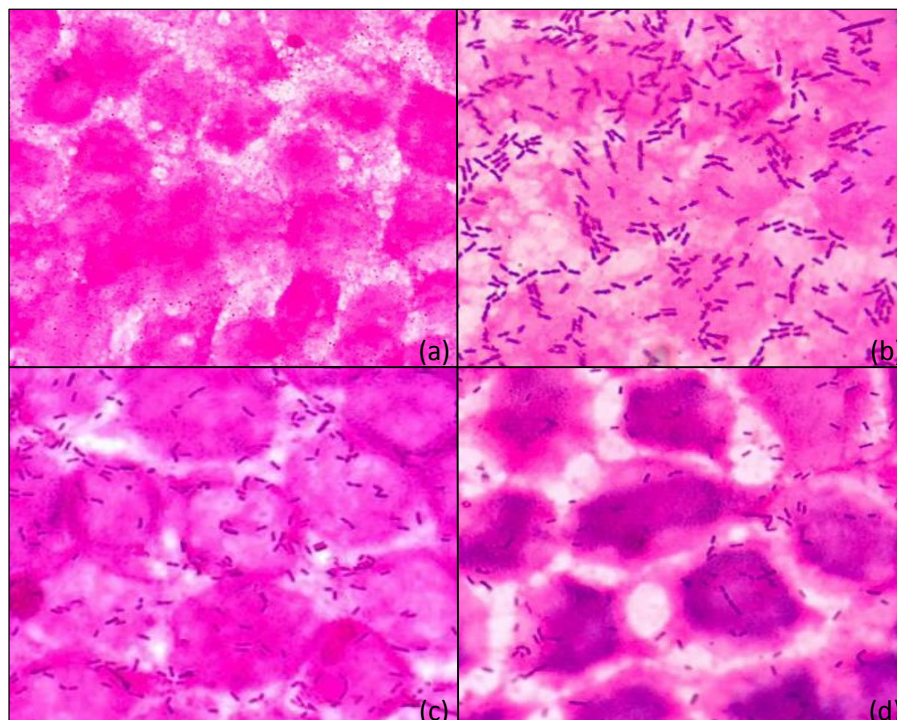
— — — : *L. acidophilus*; ..... : *L. plantarum* ATCC 8014; — — — : *L. parabuchneri* ML4; — · · : *L. paracasei* ML13; — : *L. paracasei* ML24; — : *L. paracasei* ML33; — — : *L. pentosus* ML82; — — — : *E. faecalis* CH121; — : *L. plantarum* CH131; — — : *L. paracasei* CH135; ..... : *L. paracasei* CH139. Média (desvio padrão), n=2.

A construção da curva de crescimento permite estipular o número de células em determinado intervalo de tempo. Desta forma, pode-se observar que o perfil de crescimento é semelhante para todos os microrganismos avaliados, e a fase estacionária, na qual os experimentos são desenvolvidos, no geral é atingida a partir de 17 horas de incubação. Ainda, a construção das curvas tem o intuito de relacionar a densidade ótica (DO) com a contagem celular em UFC.mL<sup>-1</sup> (Anexo C). Ainda, pode-se avaliar a fase do desenvolvimento no qual a bactéria se encontra através da densidade ótica, pela relação entre DO e número de UFC.mL<sup>-1</sup> presentes na amostra (Anexo C) até determinado tempo.

### **5.3 Habilidade de adesão de BALs isoladas**

Um importante critério na seleção de bactérias probióticas é a capacidade de adesão no epitélio intestinal. Diversos estudos destacam o uso de linhagens celulares, principalmente Caco-2, como modelo *in vitro* para avaliar o potencial de colonização de isolados bacterianos (RIEDEL et al., 2006; CANDELA et al., 2008; TSAI et al., 2011; RANADHEERA et al., 2014; FENG et al., 2015; URÓIC et al., 2016; BELGUESMIA et al., 2016). Desta forma, a habilidade de adesão das bactérias lácticas em células Caco-2 foram testadas nesse estudo e confirmada para todos os isolados avaliados. Estes foram divididos em 3 grupos considerando o resultado de adesão. Os que apresentaram alta aderência (> 1500 bactérias/100 células), moderada aderência (1000–1490 bactérias/100 células) e baixa aderência (< 1000 bactéria/100 células). A Figura 10 mostra imagens obtidas por microscopia óptica das BALs aderidas na monocamada de células Caco-2.

Figura 10. Adesão de BALs em células Caco-2



(a) Controle negativo; (b) *L. acidophilus* aderido em Caco-2 (alta aderência); (c) *L. paracasei* CH 135 aderido em Caco-2 (moderada aderência) e (d) *L. paracasei* CH 139 aderido em Caco-2 (baixa aderência). Visualização em microscópio óptico com magnitude de 1000X.

A média do número de BALs aderidas em 100 células Caco-2 foi determinada pelo índice de adesão de acordo com Gopal et al. (2001) e está descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Índice de adesão de BALs em células Caco-2

Isolado	Índice de adesão em Caco-2 (nº BALs/100 células Caco-2)
<i>L. acidophilus</i>	$1,5.10^3$ ( $3,4.10^1$ )
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	$1,62.10^3$ ( $2,32.10^2$ )
<i>L. parabuchneri</i> ML4	$1,30.10^3$ ( $7,12.10^1$ )
<i>L. paracasei</i> ML 13	$1,23.10^3$ ( $8,04.10^1$ )
<i>L. paracasei</i> ML 24	$1,42.10^3$ ( $1,02.10^2$ )
<i>L. paracasei</i> ML 33	$2,24.10^3$ ( $4,56.10^2$ )
<i>L. pentosus</i> ML 82	$1,45.10^3$ ( $1,70.10^2$ )
<i>E. faecalis</i> CH121	$1,40.10^3$ ( $6,55.10^1$ )
<i>L. plantarum</i> CH 131	$1,02.10^3$ ( $1,82.10^2$ )
<i>L. paracasei</i> CH 135	$1,43.10^3$ ( $6,80.10^1$ )
<i>L. paracasei</i> CH 139	$7,37.10^2$ ( $5,79.10^1$ )

Bactérias aderentes em 100 células Caco-2. Média (desvio padrão), n=3.

Alta aderência foi observada nos microrganismos controle, *L. acidophilus* e *L. plantarum* ATCC 8014 ( $1,5 \cdot 10^3$  bactérias/100 células), além do isolado *L. paracasei* ML33, que obteve o maior índice ( $2,24 \cdot 10^3$  bactérias/100 células). A maioria das BALs apresentaram adesão moderada ( $1,02 - 1,45 \cdot 10^3$  bactérias/100 células), e apenas o isolado *L. paracasei* CH139 apresentou baixa aderência ( $7,37 \cdot 10^2$  bactérias/100 células). Isso indica que a capacidade de adesão é específica para cada cepa. Esse processo envolve várias propriedades bioquímicas e biofísicas, tanto para a bactéria como para a linhagem tumoral. Isso inclui interações eletrostáticas, hidrofobicidade e estruturas celulares específicas. Essas propriedades podem variar entre diferentes linhagens, e levar a variações na habilidade de adesão desses microrganismos (RANADHEERA et al., 2014). Em estudo semelhante Ren et al. (2014) avaliaram a habilidade de 9 isolados de *Lactobacillus* aderir em células Caco-2. Da mesma forma, os resultados demonstram que, embora os isolados sejam do mesmo gênero, não exibiram capacidade semelhante de adesão. Valores de 912 a 73 bactérias/100 células foram encontrados, e são inferiores a adesão dos *Lactobacillus* encontrados nesse trabalho (Tabela 3), com em média, o dobro da capacidade.

Candela et al. (2008) avaliaram a interação de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em células epiteliais intestinais. O isolado *L. plantarum* Bar10 apresentou a melhor adesão, com  $2,53 \cdot 10^3$  bactérias/100 células. Já *L. acidophilus* Bar13 uma adesão moderada de  $5,28 \cdot 10^2$  bactérias/100 células. Ainda em trabalho anterior, Candela et al. (2005) avaliou a adesão de 9 *Bifidobacterium* em células Caco-2. Um fenótipo extremamente variável de adesão pode ser observado com os diferentes isolados, sendo que em sua maioria, uma contagem de  $3 \cdot 10^3$  bactérias/célula foi encontrada. Por fim, Kim; Park; Ji, (2003) caracterizaram o potencial de adesão de *Bifidobacterium* em células Caco-2. Mais uma vez, variações na aderência entre as bactérias testadas, mesmo que do mesmo gênero, foram observadas. Nesse caso, os autores demonstram uma adesão de 500 bactérias/50 células Caco-2 como melhor resultado apresentado.

A capacidade de bactérias lácticas em aderir às células epiteliais intestinais tem um papel importante no estabelecimento e colonização do trato gastrintestinal. Essa associação é responsável por mediar a interação entre a bactéria e o sistema imune do hospedeiro, exercendo importantes funções benéficas. Além disso, a bactéria compete com agentes patógenos que possam estar presentes nesse ambiente (REN et al., 2014). Desta forma, todos os isolados testados apresentaram potencial de

adesão nas células intestinais, de forma isolada, podendo contribuir na manutenção no organismo.

## 5.4 Encapsulamento de BALs

### 5.4.1 Análise físico-química de subprodutos da indústria de laticínios

A incorporação de ingredientes no desenvolvimento de novos produtos que oferecem benefícios de saúde é crescente. Sendo assim, a adaptação de novas tecnologias industriais tornam-se necessárias, aliada ao baixo custo de produção (LAVARI et al., 2014). A inclusão de subprodutos do processamento de alimentos é uma alternativa para minimizar o impacto dos resíduos descartados, dando a eles uma nova aplicação. Entre eles, os subprodutos dos laticínios têm destaque de aplicação para o encapsulamento de microrganismos (PIMENTEL-GONZÁLEZ et al., 2009; BURGAIN et al., 2013; LAVARI et al., 2014; ARSLAN et al., 2015; LAVARI et al., 2015; SLUKOVÁ et al., 2016). Estes são gerados no processamento da indústria de laticínios, e responsáveis por demandar alto custos de tratamento devido a sua elevada carga orgânica (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013). No entanto, para a aplicação na produção de alimentos, é essencial conhecer a composição destes, visando assim a sua aplicabilidade. Desta forma, na Tabela 4 estão descritas as características físico-químicas de soro de queijo, permeado de soro e retentado de soro, sub-produtos utilizado neste trabalho.

Tabela 4. Caracterização físico-química do soro de queijo, permeado e retentado utilizados na produção das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014

Caracterização	Sólidos totais (%)	Cinzas (%)	Lipídios (%)	Proteína (%)	Carboidratos (%)
Soro de queijo	6,18 (0,01)	0,37 (0,02)	0,20 (0,04)	0,37 (0,04)	5,24 (0,03)
Permeado	6,57 (0,03)	0,45 (0,05)	0,21 (0,06)	0,06 (0,02)	5,85 (0,04)
Retentado	17,88 (0,06)	1,15 (0,03)	0,33 (0,09)	1,37 (0,10)	15,03 (0,07)

Média (desvio padrão), n=3.

As características físico-químicas de sub-produtos estão associadas aos processos de separação em que estes são submetidos. Soro de queijo e permeado diferem entre si, principalmente, na quantidade de proteínas, que é mais pronunciada

no soro de queijo, como descrito na Tabela 4. Isso ocorre pois as proteínas contidas no soro de queijo são separadas por um processo de ultrafiltração, produzindo o permeado, que é majoritariamente constituído por lactose e sais. Assim, é provável que a quantidade de carboidratos presentes no permeado seja praticamente a lactose (HUGO; BRUNO; GOLOWCZYC, 2016). Já o retentado de soro é obtido a partir do soro de queijo pelo processo de nanofiltração. Neste caso, todos os componentes são concentrados pela remoção da água, proporcionando um aumento destes, e obtendo o retentado de soro.

#### 5.4.2 Microencapsulamento por spray drying

##### 5.4.2.1 Viabilidade das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 após *spray drying*

A viabilidade de *L. plantarum* ATCC 8014 após o processo de encapsulamento por *spray drying* utilizando soro de queijo, permeado e retentado de soro estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Viabilidade de *L. plantarum* ATCC 8014 antes e após *spray drying* utilizando soro de queijo, permeado e retentado como material encapsulante

Microcápsulas	Número de células viáveis		Redução log
	Antes do <i>spray drying</i> (log UFC.g <sup>-1</sup> )	Após o <i>spray drying</i> (log UFC.g <sup>-1</sup> )	
Soro de queijo	10,68 (0,05)	10,26 (0,06)	0,42 <sup>b</sup>
Permeado	10,88 (0,12)	9,98 (0,01)	0,90 <sup>a</sup>
Retentado	10,08 (0,11)	10,00 (0,08)	0,08 <sup>b</sup>

<sup>a-b</sup> Média (desvio padrão), n=3. Diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa (p < 0,05).

A contagem inicial antes do processo de encapsulamento foi na faixa de 10,08-10,88 log UFC.g<sup>-1</sup> e após o processo, o número de células viáveis reduziu 0,08-0,90 ciclos log. Microcápsulas de permeado (MP) apresentaram uma redução mais pronunciada na viabilidade celular (p < 0,05). A proteção da célula bacteriana no encapsulamento é adquirida principalmente pela interação entre proteínas e açúcares presentes nos subprodutos aplicados como materiais de parede. No caso do

permeado, o seu principal constituinte é a lactose (LAVARI et al., 2015; HUGO; BRUNO; GOLOWCZYC, 2016). Sendo assim, a agregação das moléculas pode ser afetada reduzindo o efeito protetor à célula. Microcápsulas de soro (MS) e Microcápsulas de retentado (MR) apresentaram resultados semelhantes após o encapsulamento ( $p > 0,05$ ) por apresentarem proteínas e lactose como principais constituintes. A principal diferença entre ambos é a quantidade de água presente, resultante do processo aplicado na concentração do soro de queijo.

Jantzen, Göpel e Beermann (2013) estudaram o processo de microencapsulamento de *Lactobacillus reuteri* com soro de queijo por *spray drying*, utilizando duas temperaturas para secagem ( $55 \pm 2$  °C e  $65 \pm 2$  °C). Foram aplicadas  $9,20 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  de bactérias, e após o processo de encapsulamento uma redução de  $1,81 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  foi observada, independente da temperatura. Com temperatura superior de secagem, e o mesmo material encapsulante, uma redução em torno de 4 vezes menor foi encontrada neste trabalho (Tabela 5).

Duongthingoc et al. (2013) avaliaram o efeito do pH (entre 4 e 7) e temperatura (70-90 °C) aplicada no microencapsulamento de *Saccharomyces boulardii* por *spray drying*. Utilizaram como material de parede o isolado proteico de soro, um produto dos laticínios, porém com alto valor agregado. Após o processo, a temperatura de 90 °C (pH 4) registrou a maior viabilidade celular (redução de  $0,43 \log \text{ CFU.mL}^{-1}$ ). Uma temperatura similar foi aplicada nesse trabalho (70 a 90 °C), obtendo da mesma forma, uma redução semelhante da viabilidade do microrganismo. Porém, materiais de parede de baixo custo foram aplicados, e demonstraram ter o mesmo potencial de proteção ao microrganismo.

A alta temperatura aplicada no processo de *spray drying* é um fator crítico na viabilidade das bactérias (SOUKOULIS et al., 2014). No entanto, é necessária para promover a evaporação de água das cápsulas, para que a umidade seja de 4-7%, mantendo a estabilidade do encapsulado (JANTZEN; GÖPEL; BEERMANN, 2013). Geralmente temperaturas na faixa de 120 a 180 °C são utilizadas no encapsulamento por *spray drying* (RODRIGUES et al., 2011; DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012; LAVARI et al., 2014; MACIEL et al., 2014; SOUKOULIS et al., 2014; ILHA et al., 2015; PINTO et al., 2015; HUGO; BRUNO; GOLOWCZYC, 2016), porém essa faixa pode ser prejudicial quando aplicada em microrganismos. Portanto, o uso de temperaturas mais amenas para a secagem pode ser aplicado como uma alternativa para minimizar



este impacto, melhorando a eficiência do encapsulamento. Diante disso, a temperatura de 90 °C foi utilizada nesse estudo e provou ser uma condição apropriada para o encapsulamento com soros lácteos, mantendo a viabilidade das células após o processo de *spray drying* (Tabela 5).

Hugo, Bruno e Golowczyc (2016) aplicaram permeado de soro como meio de crescimento e material encapsulante de *L. plantarum* CIDCA 83114, na presença ou ausência de galacto-oligossacidos (GOS). As microcápsulas foram obtidas por *spray drying*, a uma temperatura de 170 °C. Os autores não encontraram nenhuma diferença na viabilidade celular (valor acima de  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup>) no uso de GOS, demonstrando que o permeado é um material de parede adequado, e confere proteção para as células bacterianas a temperaturas elevadas aplicadas no processo de secagem.

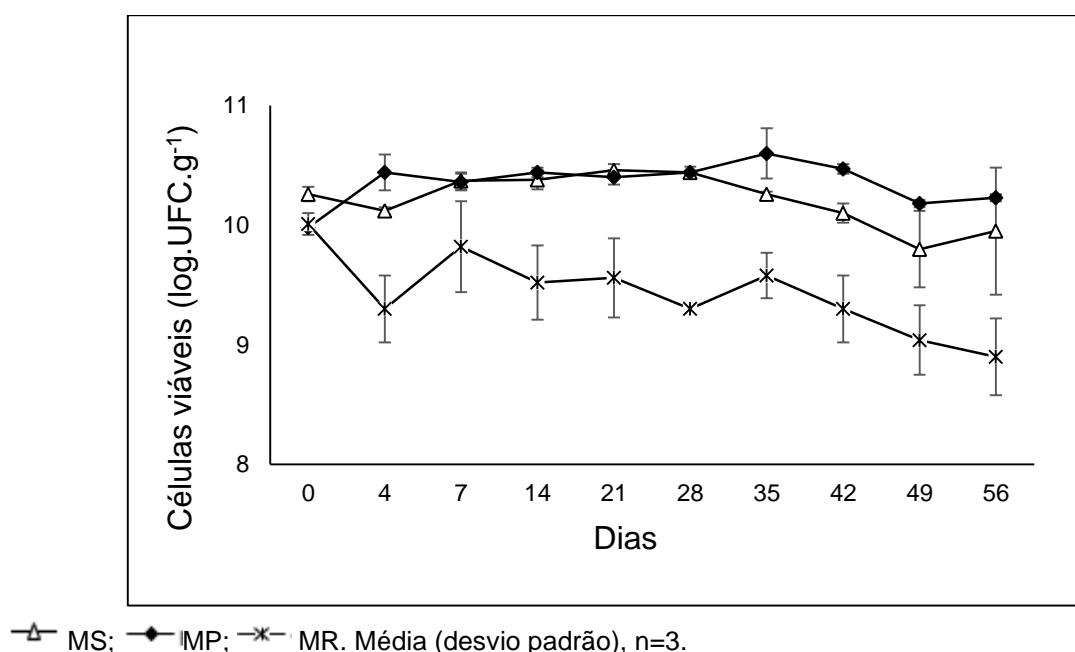
Em estudo com soro de queijo e retentado de soro, Pinto et al. (2015) produziram microcápsulas de *Bifidobacterium BB-12* por *spray drying* a 150 °C, na presença ou ausência de prebióticos (inulina ou polidextrose) juntamente com o material da parede. Da mesma forma, os autores não observaram diferença entre o uso de ambos soros lácteos isolados (redução 0,44-0,53 log UFC.g<sup>-1</sup>), ou na presença de inulina. Já a adição de polidextrose apresentou uma redução mais acentuada de células viáveis (0,42-0,77 log UFC.g<sup>-1</sup>). Esses resultados corroboram com os descritos neste trabalho (Tabela 5), indicando que os soros aplicados são eficientes na proteção de probióticos, mesmo em elevadas temperaturas de secagem aplicadas ao processo de *spray drying*.

Soros lácteos são uma fonte alternativa e rentável da obtenção de proteínas e açúcares, e de acordo com estudos da literatura, são adequados no uso como materiais encapsulantes. Porém, na sua maioria, são combinados com outros agentes protetores. Esse estudo demonstrou que mesmo isolados, ou seja, sem a adição de um outro agente, o uso desses soros demonstraram ter o mesmo efeito protetor no encapsulamento de bactérias por *spray drying*.

#### 5.4.2.2 Sobrevivência das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 ao armazenamento

As microcápsulas (MS, MP e MR) foram armazenadas a 20 °C. Esta temperatura foi escolhida porque é a maneira mais econômica para armazenamento de produtos secos. A sobrevivência das microcápsulas de *L. plantarum* foram avaliadas em diferentes momentos, por um período de 56 dias, e os resultados são mostrados na Figura 11.

Figura 11. Viabilidade das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 (log UFC.g<sup>-1</sup>) durante 56 dias de armazenamento a 20 °C



As MS e MP não apresentaram redução na viabilidade após o armazenamento, mas MR obteve uma redução de 1,11 ciclos log ( $p < 0,05$ ) após 56 dias. No entanto, todas as microcápsulas mantiveram uma contagem de *L. plantarum* acima de 6 log.UFC.g<sup>-1</sup>, que é a quantidade mínima exigida de bactérias probióticas em alimentos funcionais (FAO/WHO, 2002). No mesmo período, não foi observada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre a viabilidade das MS e MP, indicando que o material da parede foi capaz de proteger as bactérias encapsuladas.

De Castro-Cislaghi et al. (2012) avaliaram a sobrevivência de *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulado com soro de queijo por spray drying. A contagem celular manteve-se constante com valores acima de 9 log UFC.g<sup>-1</sup> após 12 semanas de

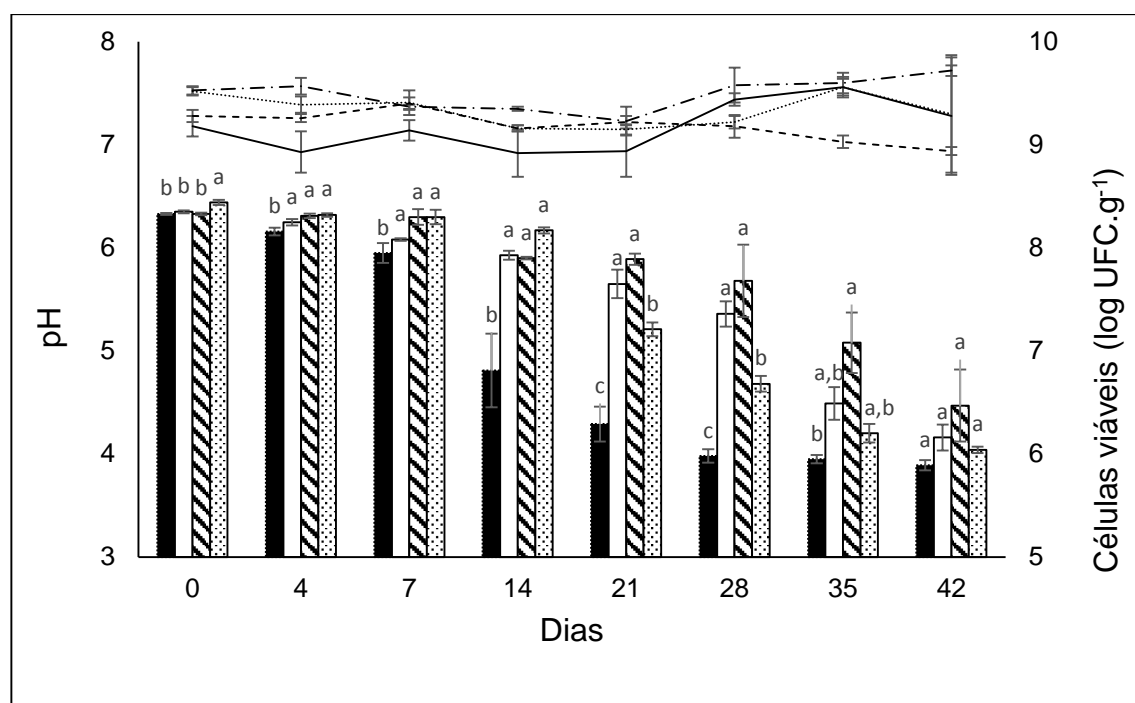
armazenamento, porém a uma temperatura de 4 °C. Resultado semelhante ao encontrado neste trabalho, porém sem a necessidade de resfriamento. Nas mesmas condições de armazenamento, Hugo, Bruno e Golowczyc (2016) microencapsularam *L. plantarum* CIDCA 83.114 com permeado de soro na ausência e presença de galactooligosacarídeos (GOS) por *spray drying* e armazenaram as microcápsulas durante 70 dias a 20 °C. Após 10 semanas uma redução de 2,5 log UFC.g<sup>-1</sup> foi observada, mesmo na combinação com GOS. Este é um indicativo de que o permeado de soro, utilizado como material da parede, é adequado para o encapsulamento de microrganismos. Uma redução semelhante foi descrita por Coghetto et al. (2016a) no microencapsulamento de *L. plantarum* com alginato de sódio por *electrospray*. Os autores avaliaram a viabilidade das microcápsulas armazenadas durante seis meses a 25 ± 1 °C, sem o uso de refrigeração das mesmas. Eles observaram uma redução de 3,5 log UFC.g<sup>-1</sup> após o período de armazenamento. Entretanto, obtiveram uma concentração final acima de 7 log UFC.g<sup>-1</sup>, que é acima da recomendação de microrganismos inseridos em alimentos funcionais.

Um fator importante que pode contribuir na viabilidade celular no período de armazenamento são as propriedades dos materiais de parede aplicadas. A lactose, açúcar presente no leite, juntamente com as proteínas do soro de queijo, principalmente compostas por β-lactoglobulina, α-lactoglobulina e glicomacropéptido, são muito aplicadas no encapsulamento de bactérias. Elas interagem com os fosfolípidios da membrana celular do microrganismo durante a remoção da água no processo de secagem, e são responsáveis pela proteção das células ao longo do período de armazenamento (SMITHERS, 2008; CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; MACIEL, et al., 2014; SMITHERS, 2015). Além disso, há necessidade crescente no desenvolvimento de produtos em pó secos, principalmente aqueles que contém células vivas, para que se mantenham viáveis ao longo do tempo em temperatura ambiente. O custo de manutenção e distribuição de alimentos que utilizam a cadeia do frio para o armazenamento é drasticamente aumentada, dificultando sua inclusão no mercado. Desta forma, desenvolver técnicas que proporcionem uma maior estabilidade das células ao longo do tempo sem a necessidade de um fator adicional para sua manutenção diminui o custo e amplia o mercado dos alimentos funcionais (COGHETTO; BRINQUES; AYUB, 2016b).

### 5.4.2.3 Sobrevivência e capacidade de acidificação das microcápsulas de *L. plantarum* 8014 armazenadas em leite

As microcápsulas (MS, MP e MR) foram incorporadas no leite e armazenadas a 4 °C durante 42 dias. Além disso, uma amostra de *L. plantarum* não encapsulado foi exposto diretamente no leite, e utilizada como controle. A contagem de células viáveis está demonstrada na Figura 12.

Figura 12. Mudanças no pH e contagem de células viáveis (log UFC.g<sup>-1</sup>) no armazenamento a 4 °C em leite



pH: ■ *L. plantarum* ATCC 8014 livre; □ Microcápsulas de soro de queijo; ▨ Microcápsulas de permeado de soro; ▤ Microcápsulas de retentado de soro; Células viáveis: - - - - *L. plantarum* ATCC 8014 livre; . . . . Microcápsulas de soro de queijo; ..... Microcápsulas de permeado de soro; ——— Microcápsulas de retentado de soro. a-c Média (desvio padrão), n=3. Letras diferentes sobrescritas no mesmo período indicam diferença significativa (p < 0,05).

Para todas as amostras armazenadas, a contagem de células manteve-se elevada e constante (> 9 log CFU.g<sup>-1</sup>), possivelmente devido a lenta desintegração das microcápsulas durante o período armazenado. Além disso, *L. plantarum* livre manteve-se estável ao longo do tempo, sugerindo que o substrato (lactose) disponível foi permeável à microcápsula, sendo utilizado como fonte de energia para o processo de fermentação dos microrganismos (ANAL; SINGH, 2007). A técnica de

encapsulamento aplicada nesse trabalho, bem como as condições experimentais, foram capazes de assegurar uma maior viabilidade dos microrganismos aplicados em produtos lácteos, quando comparado a estudos já publicados. Por exemplo, Ribeiro et al. (2014) encapsularam *L. acidophilus* LA-5 com pectina e concentrado proteico de soro (WPC), um produto de alto valor agregado, derivado do soro de queijo, por gelificação iônica e complexo de coacervação. As microcápsulas foram expostas em iogurte e armazenadas por 35 dias a  $5 \pm 1$  °C. A contagem celular inicial foi  $\approx 7$  log CFU.mL<sup>-1</sup> e após o armazenamento uma redução de 0,20-0,98 ciclos log foi observada. De Castro- Cislighi et al. (2012) microencapsularam *Bifidobacterium* BB-12 com soro de leite por *spray drying* e incorporaram esses encapsulados em sobremesas lácteas. Após 6 semanas de armazenamento foi observada uma redução de  $1,16 \pm 0,05$  log UFC.g<sup>-1</sup>, porém, ainda assim as células mantiveram-se estáveis com uma elevada contagem acima de 7 log UFC.g<sup>-1</sup>. Özer et al. (2009) microencapsularam *B. bifidum* BB-12 e *Lactobacillus acidophilus* LA-5 com alginato e κ-carragena, aplicando as cápsulas no período de amadurecimento de queijos. A sobrevivência foi avaliada por 90 dias. Para BB-12 livre, uma redução de 3,93 log foi observada, enquanto as células microencapsuladas apresentaram uma redução menor, na faixa de 2,23-2,75 log. Para LA-5 a redução manteve-se estável, com 3,01 ciclos log para a célula livre e 1,45- 2,04 ciclos log nas microcápsulas.

Na figura 12 observa-se que o pH do leite foi significativamente afetado ( $p < 0,05$ ) pela inserção de células livres ou microencapsuladas. Durante o armazenamento, o leite contendo as células livres apresentou uma rápida acidificação, quando comparada com os microencapsulados. Até 14 dias de armazenamento, MS, MP e MR mantiveram o pH constante, diferindo apenas da célula livre. No entanto, após 42 dias, ao final do armazenamento, todas as amostras apresentam o mesmo valor ( $p > 0,05$ ) com o pH  $4,14 \pm (0,21)$ . Assim como para a viabilidade celular, os resultados de redução do pH sugerem que a lactose foi permeável a microcápsula, permitindo o processo fermentativo desses microrganismos. Porém, as microcápsulas dificultaram o acesso desse substrato, o que pode ser verificado pela diferença nos tempos iniciais de acidificação entre a célula livre e encapsulada. Ribeiro et al. (2014) expuseram *L. acidophilus* LA-5 livre e encapsulado em iogurte, o microrganismo livre acidificou mais (pH 4,17) quando comparado ao microencapsulado (pH 4,34), que manteve-se constante após 7 dias

de armazenamento, resultado semelhante ao encontrado nesse trabalho. A menor acidificação de leite e seus derivados contendo microcápsulas sugere que o processo de encapsulamento reduz a atividade microbiana.

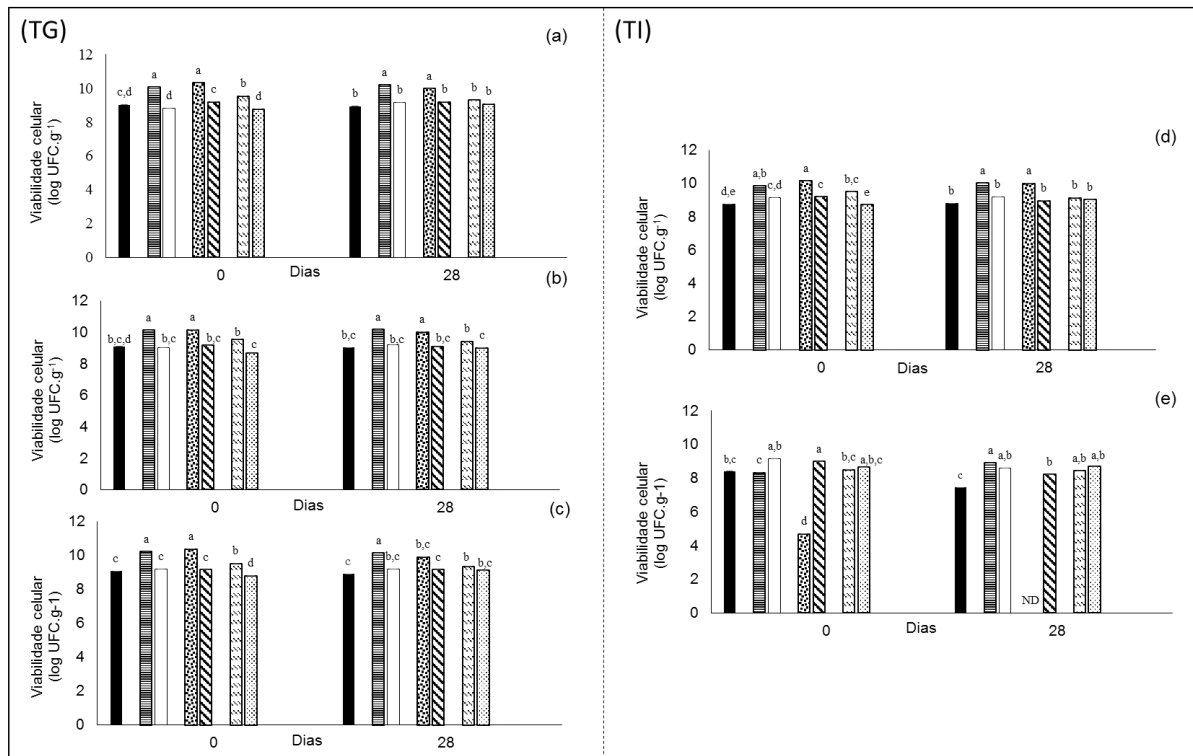
A viabilidade de *L. plantarum* microencapsulado por secagem por *spray drying* demonstra que os subprodutos lácteos aplicados têm um potencial na utilização como agentes protetores no encapsulamento de microrganismos quando inseridos em produtos alimentares.

#### **5.4.2.4 Sobrevivência das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 ao trato gastrointestinal simulado**

Diversas BALs são responsáveis por promover benefícios à saúde, como a produção de ácido e/ou bacteriocinas, melhora do sistema imune e competição com patógenos. Para isso, elas devem ser metabolicamente estáveis e ativas, além de sobreviver à passagem do trato gastrointestinal em grande número, para, assim, atingir o intestino e promover seus efeitos benéficos no hospedeiro (ANAL; SINGH, 2007; VIVEK, 2013; MARTÍN et al., 2015). Portanto, é de extrema importância avaliar a viabilidade de microrganismos à exposição de enzimas, baixos níveis de pH do estômago e presença de sais biliares no intestino.

A viabilidade do *L. plantarum* livre e livre inserida no leite, bem como as MS, MP e MR armazenadas a 20 °C e inseridas no leite armazenadas a 4 °C durante 28 dias foram avaliadas quanto ao trato gastrointestinal simulado, e estão descritas na Figura 13.

Figura 13. Viabilidade de *L. plantarum* ATCC 8014 (log UFC.g<sup>-1</sup>) durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 0 e 28 dias de armazenamento



TG (Trato gástrico): Suco gástrico durante 180 minutos (a) pH 2, (b) pH 2,5 e (c) pH 3; TI (Trato intestinal) suco intestinal durante 240 minutos (d) sem sais biliares e (e) com 0,5 % (m/v) de sais biliares.

■ *L. plantarum* ATCC 8014 livre armazenado em leite a 4 °C; ▨ MS armazenadas a 20 °C; □ MS armazenadas no leite a 4 °C; ▩ MP armazenadas a 20 °C; ▤ MP armazenadas no leite a 4 °C; ▦ MR armazenadas a 20 °C; ▧ MR armazenados em leite a 4 °C. <sup>a-d</sup> Média (desvio padrão), n=3. Diferentes letras sobrescritas no mesmo período indicam diferença significativa (p < 0,05). ND = Não detectado.

No geral, as amostras livre e microencapsuladas de *L. plantarum* (Figura 13 a-e) demonstraram resultados semelhantes de viabilidade ( $p > 0,05$ ) quando inseridas no leite (8,76 – 9,19 log UFC.g<sup>-1</sup>). Após 28 dias de armazenamento, estes resultados mantiveram-se semelhantes (8,90 - 9,19 log UFC.g<sup>-1</sup>), sem perda na viabilidade celular. A capacidade de sobrevivência de *L. plantarum* livre inserida no leite ao longo do tempo pode ser sugerida pelo aumento do pH do meio na presença desse alimento. Segundo Tulumoglu, Kaya & Simsek (2014), o pH no estômago humano pode aumentar durante a ingestão de alimentos para um valor próximo de 4,5, melhorando

a capacidade de sobrevivência de microrganismos. Neste caso, a exposição das bactérias em leite ao TGI foi um fator que contribuiu na sua viabilidade, provavelmente pelo aumento do pH do meio, ocasionado pelo pH do leite que é próximo a 7 (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013).

Para o trato gástrico, testado pela incubação de 3 mg.mL<sup>-1</sup> de pepsina a pH 2, 2,5 e 3, a maior capacidade de sobrevivência de *L. plantarum* foi observada nas microcápsulas armazenadas a 20 °C, onde, no tempo inicial (9,52-10,38 log UFC.g<sup>-1</sup>) e após 28 dias de armazenamento (9,30-10,20 log UFC.g<sup>-1</sup>) os resultados mantiveram-se elevados e semelhantes. A presença de pepsina e diferentes pHs no qual as microcápsulas foram expostas (Figura 13a-c), não afetou a viabilidade das células.

Para trato intestinal, as amostras foram incubadas com 1 mg.mL<sup>-1</sup> de pancreatina a pH 8, com ou sem adição de 0,5% (m/v) sais biliares. Na presença de pancreatina (Figura 13d), todas as microcápsulas apresentaram viabilidade celular semelhante tanto no tempo inicial, anteriormente ao processo de digestão, como após 28 dias de armazenamento, sendo esse superior a 8 log UFC.mL<sup>-1</sup>. No geral, enzimas digestivas tais como a pepsina e pancreatina, embora consideradas danosas para o microrganismo, têm menos influência sobre a viabilidade das bactérias, e os fatores como baixo pH e a concentração de sais biliares presente são críticos (RANADHEERA et al., 2014). Entretanto, observou-se que a principal perda de viabilidade ocorreu na presença de 0,5% (m/v) de sais biliares (Figura 13e), para MP. Neste caso, uma redução de 5 log CFU.mL<sup>-1</sup> foi encontrada no tempo inicial, e após 28 dias de armazenamento nenhum *L. plantarum* sobreviveu nas microcápsulas. Estes resultados podem ser associados com a composição físico-química dos subprodutos aplicados como material da parede. O permeado de soro tem um teor menor de proteínas em sua composição, devido ao seu processo de produção, sendo constituído, principalmente, de lactose. Isto pode diminuir o seu efeito protetor, na qual é causado pela interação entre as proteínas e a lactose presente no soro (YOUNG; SARDA; ROSENBERG, 1993; MACIEL et al., 2014).

Além disso, uma amostra de *L. plantarum* não encapsulado foi exposta diretamente no trato gastrintestinal simulado, e utilizado como controle. Neste caso isolados exibiram uma tolerância menor quanto às amostras microencapsuladas. Para trato gástrico em pH 2 não foi observada sobrevivência das células bacterianas, enquanto que para pH de 2,5 e 3 uma redução de 5 log ciclos e 1,9, respectivamente



foi observada. Para trato intestinal, a contagem de células manteve-se semelhante na ausência de 0,5% (m/v) sais biliares, mas na presença, uma redução de 0,67 log foi observado.

Estes resultados indicam que o *L. plantarum* ATCC 8014 foi protegido, principalmente nas amostras microencapsuladas com soro de queijo e retentado de soro, criando um ambiente adequado para a sobrevivência desses em condições ácidas e sais biliares simulando o TGI. A viabilidade das bactérias inseridas em alimentos durante a vida de prateleira, assim como a passagem através do TGI podem ser assim melhoradas pelo processo de microencapsulamento.

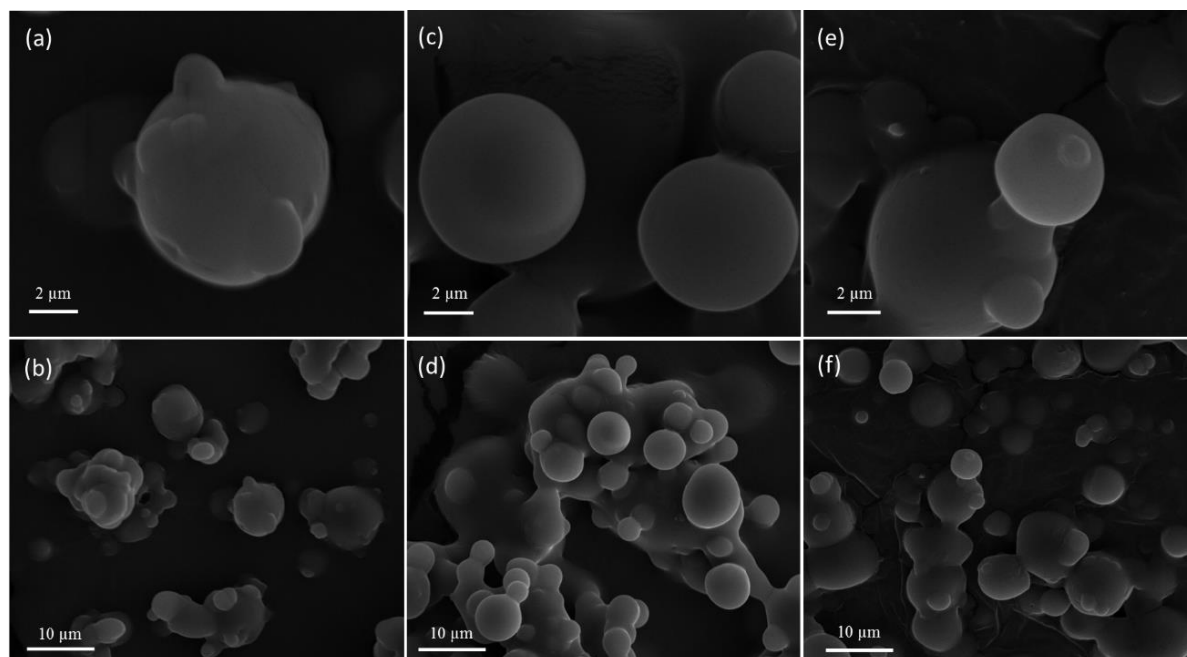
#### **5.4.2.5 Caracterização das microcápsulas**

##### **5.4.2.5.1 Morfologia e tamanho de partícula**

A morfologia bem como o tamanho de partícula são diretamente influenciados por parâmetros da secagem, como a solução de alimentação, tipo de bico pulverizador, pressão de atomização e taxa de alimentação (ILHA et al., 2015). Além disso, as microcápsulas não podem afetar as propriedades sensoriais quando inseridas em produtos alimentícios, para isso devem apresentar valores de diâmetro <100 µm (BURGAIN et al., 2011; MARTÍN et al., 2015).

A Figura 14 revela as micrografias de MEV das microcápsulas secas por *spray drying*, utilizando como materiais encapsulantes soro de queijo (Figura 14a-b), permeado de soro (Figura 14c-d) e retentado de soro (Figura 14e-f).

Figura 14. Microfotografias de MEV das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 obtidas por *spray drying*



Soro de queijo (a) 15000 x (b) x 4000; permeado (C) x 15000 (d) x 4000; e retentado (E) 15000 x (f) x 4000.

O uso dos diferentes materiais de parede não mostrou diferenças na morfologia. Todas as microcápsulas apresentaram formato esférico com parede contínua, sem quaisquer fendas e fissuras na superfície das partículas. Isso é um atributo benéfico, pois um material de parede contínuo protege o encapsulado, implicando na sobrevivência de *L. plantarum*. O tamanho da partícula foi semelhante entre as amostras, com a diâmetro médio de  $7,0 \pm 1,0 \mu\text{m}$ . Em geral, partículas com características semelhantes foram descritas em outros estudos prévios da literatura, no entanto aplicando apenas um destes materiais da parede (RIVEROS; FERRER; BÓRQUEZ, 2009; SOUKOULIS et al., 2014; ILHA et al., 2015; PINTO et al., 2015). As variações no diâmetro das cápsulas em diferentes trabalhos pode ser atributo por diferentes tamanhos do bico de pulverização aplicados no processo de *spray drying*.

#### 5.4.2.5.2 Umidade, atividade de água e análise de cor

As microcápsulas contendo *L. plantarum* apresentaram resultados de umidade, atividade da água e cor de acordo com o tipo de material de parede aplicado, como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6. Características das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 preparadas com soro de queijo, permeado e retentado

Microcápsulas	Umidade (%)	Atividade de água	Parâmetros de cor
Soro	4,15 (1,33)	0,251 (0,01)	L* = 93,75 (0,57) a* = 0,42 (0,20) b* = 9,83 (0,48)
Permeado	3,05 (0,33)	0,189 (0,11)	L* = 97,38 (0,23) a* = -0,80 (0,12) b* = 5,82 (0,16)
Retentado	3,78 (0,87)	0,196 (0,02)	L* = 82,84 (0,17) a* = 3,17 (0,04) b* = 22,63 (0,14)

Média (desvio padrão), n=3.

A maior umidade, em média, foi da MS com  $4,15 \pm 1,33\%$ , seguido da MP  $3,05 \pm 0,33\%$  e MR com  $3,78 \pm 0,87\%$ . A atividade da água do pó obtido foi de  $0,251 \pm 0,01$ ,  $0,196 \pm 0,189$  e  $0,02 \pm 0,11$ , respectivamente. Este teor de umidade encontrado pode ser responsável por manter as bactérias viáveis, evitando a morte celular durante o armazenamento da cultura seca. Já a atividade de água de todas as microcápsulas estão no intervalo de produtos atomizados ( $<0,60$ ). Além disso, estes parâmetros são fatores críticos que influenciam a estabilidade ao armazenamento de microrganismos, para que possam sobreviver melhor, com menos água no meio (DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012).

A análise colorimétrica das microcápsulas secas por *spray drying* estão descritas na Tabela 6, onde o parâmetro L\* foi elevado para todos os materiais da parede aplicado nos microencapsulados, indicando uma cor clara, tendendo ao branco. O parâmetro a\* apresentou valor positivo para MS e MR, tendendo ao vermelho, e negativo para MP, tendendo a verde. O parâmetro b\* mostrou valor positivo para os três tipos de microcápsulas, tendendo a cor amarela. Esses parâmetros de cor encontrados podem ser explicados primeiramente pela cor do soro de queijo, considerado um subproduto amarelo-esverdeado (SISO, 1996; CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013). Além disso, a tendência a estas colorações está provavelmente relacionada à reação de Maillard, que ocorre pela redução entre os açúcares e proteínas durante o processo de microencapsulamento (DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012). O conhecimento do perfil colorimétrico das microcápsulas é

importante quando visa-se a aplicação dos mesmos em produtos alimentícios, de forma que não este não afete a sensorialidade do produto.

### **5.4.3 Encapsulamento através da Extrusão por tecnologia de vibração**

#### **5.4.3.1 Viabilidade dos encapsulados após a extrusão por tecnologia de vibração**

Entre as diversas tecnologias empregadas no encapsulamento de probióticos, o método de extrusão é provavelmente o mais ameno no uso com células bacterianas, pois envolve o gotejamento de uma solução hidrocolóide contendo os probióticos em uma solução de solidificação. Neste método está inserida a tecnologia de vibração (WHELEHAN; MARISON, 2011; SHI et al., 2013; DE PRISCO et al., 2015). O material encapsulante mais utilizado nesta técnica é o alginato de sódio, por sua atoxicidade, biocompatibilidade e baixo custo. Porém, este hidrocolóide apresenta uma proteção limitada ao material encapsulado. Ele forma matrizes porosas que facilitam a difusão de compostos, sendo sensível, principalmente, às condições ácidas (SHI et al., 2013). Em diversos trabalhos, outros constituintes são adicionados como material encapsulante, visando melhorar o efeito protetor fornecido pela cápsula (SANDOVAL-CASTILLA et al., 2010; CHEW et al., 2015; BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2015; PANKASEMSUK et al., 2016). Portanto, o desenvolvimento de novas abordagens de produção de micropartículas com redução na porosidade e liberação controlada pode ser conseguido através da combinação de alginato com materiais complementares. A pectina apresenta uma ação sinérgica com esse material, e já tem sido utilizada para a imobilização de diversas drogas e substâncias ativas (CHEW et al., 2015).

Ainda, componentes do leite, como proteínas e açúcares, vêm sendo aplicados devido a sua estrutura e propriedades físico-químicas, incluindo a habilidade de se ligar a pequenas moléculas, às suas propriedades de gelificação, interações com outros polímeros, e suas propriedades relacionadas às substâncias bioativas, que contribuem na manutenção à saúde (SMITHERS, 2008; EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2015). Como já descrito anteriormente, uma fonte alternativa para obtenção dessas proteínas são os soros lácteos, subprodutos oriundos dos processos dos laticínios.

Portanto, a combinação desses constituintes foi aplicado e a viabilidade dos isolados antes e após o processo de encapsulamento através da extrusão por

tecnologia de vibração, utilizando Alginato-Pectina-Soro de queijo (Al-Pc-SQ) e Alginato-Pectina-Permeado de soro (Al-Pc-PS) estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL<sup>-1</sup>) antes e após a extrusão por tecnologia de vibração

Microcápsulas	Isolado	Número de células viáveis	
		Antes do encapsulamento (log UFC.mL <sup>-1</sup> )	Após o encapsulamento (log UFC.mL <sup>-1</sup> )
Al-Pc-SQ	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	10,66 (0,17) <sup>a</sup>	9,01 (0,05) <sup>b,c</sup>
	<i>L. paracasei</i> ML33	9,47 (0,17) <sup>a,b,c</sup>	9,12 (0,58) <sup>b,c</sup>
	<i>L. pentosus</i> ML82	10,43 (0,11) <sup>a,b</sup>	9,55 (0,58) <sup>a,b,c</sup>
Al-Pc-PS	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	9,24 (0,29) <sup>a,b,c</sup>	9,13 (0,18) <sup>b,c</sup>
	<i>L. paracasei</i> ML33	9,48 (0,01) <sup>a,b,c</sup>	9,48 (0,07) <sup>a,b,c</sup>
	<i>L. pentosus</i> ML82	9,96 (0,58) <sup>a,b,c</sup>	8,58 (0,94) <sup>c</sup>

Al-Pc-SQ: Alginato-Pectina-Soro de Queijo; Al-Pc-PS: Alginato-Pectina-Permeado de Soro. <sup>a-c</sup> Média (desvio padrão), n=3. Diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa (p<0,05).

Os resultados apresentados indicam que o uso dos diferentes soros lácteos apresentaram o mesmo efeito protetor aos microrganismos (p<0,05). Ainda, na maioria dos casos, o processo de encapsulamento não afetou a viabilidade (p<0,05), mantendo a alta contagem celular de todos os isolados ( $\approx 9$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Desta forma, torna-se uma alternativa na adição em alimentos, principalmente por estar em conformidade com a exigência da legislação (FAO/WHO, 2002; ANVISA, 2008) em relação a concentração de probióticos a ser consumido, para fornecer propriedades funcionais ao indivíduo.

Os materiais encapsulantes aplicados forneceram proteção aos microrganismos estudados. Autores relatam que os alginatos podem formar complexos fortes com outros polímeros naturais, tais como a pectina, permitindo a associação em cadeia entre esses hidrogéis, após a adição de cations divalentes (por exemplo, Ca<sup>2+</sup>). Isso gera uma melhora na estabilidade química e mecânica do alginato, e, conseqüentemente, na eficiência de encapsulamento (SANDOVAL-CASTILLA et al., 2010; CHEW et al., 2015). Ainda, a aplicação em conjunto de outros materiais, como os soros lácteos, contribuem ainda mais na estrutura formada entre

os hidrogéis aplicados, fortificando a barreira imposta pelo encapsulamento e reduzindo a taxa de difusão de outros compostos nas cápsulas (SHI et al., 2013)

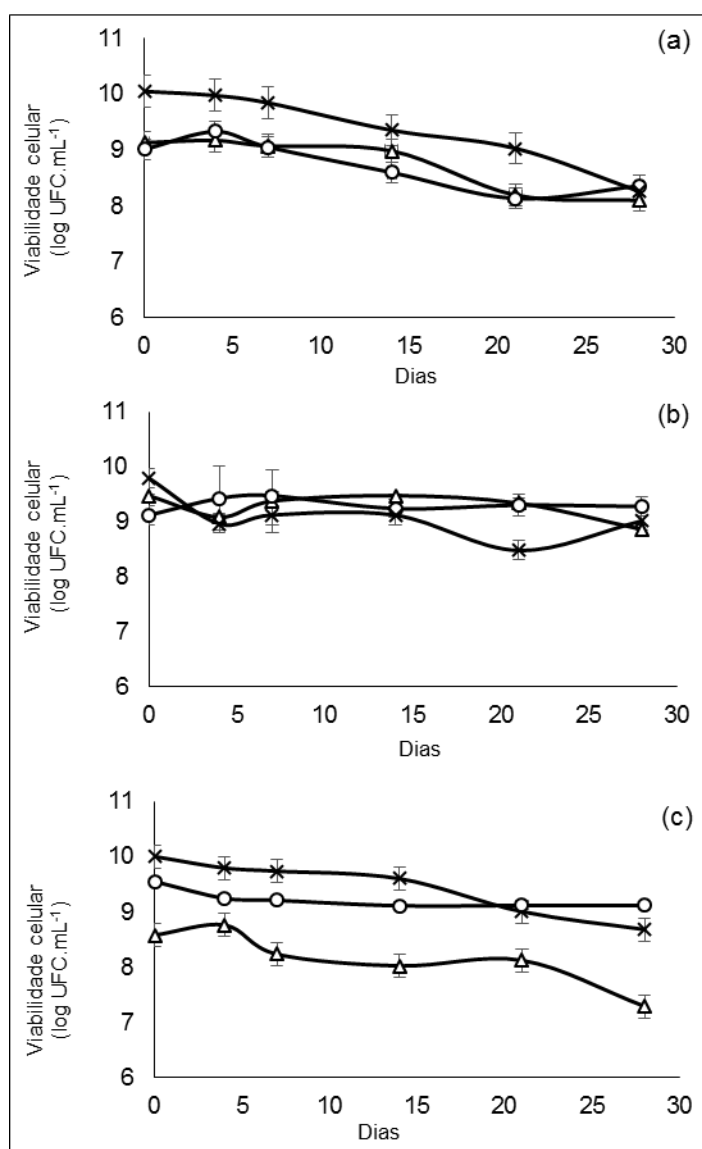
Os materiais encapsulantes utilizados são todos seguros para consumo, por serem na sua maioria polímeros naturais oriundos de algas e plantas. Além disso, os soros lácteos também apresentam ingredientes importantes na sua constituição (BURGAIN et al., 2011; MARTÍN et al., 2015). No caso da aplicação em alimentos, um fator chave é o tamanho de cápsula formado, já que partículas de menor diâmetro são mais adequados para formulações alimentares garantindo um produto homogêneo e de qualidade, sem afetar a sensorialidade do produto (MARTÍN et al., 2015; ARSLAN et al., 2015). Sendo assim, o tamanho da cápsula formada neste método é resultante do bico utilizado, ou seja, um bico de 80 µm formará cápsulas com diâmetro em torno de 160 µm (BÜCHI – Ficha técnica Encapsulator B-395 Pro), adequado para inserção em alimentos. A maioria dos trabalhos que utilizam a tecnologia de vibração produzem cápsulas com diâmetro maior (DEL GAUDIO et al., 2005; MARTONI et al., 2008; MAZZITELLI et al., 2008; SHI et al., 2013; NEMETHOVA; LACIK; RAZGA, 2014), o que pode ser um fator negativo quando visa a aplicabilidade.

A extrusão por tecnologia de vibração, por se tratar de um método que envolve principalmente a ruptura física de uma solução polimérica contendo o material sensível, e a troca iônica no processo de polimerização e endurecimento das cápsulas, revelou-se adequada no uso com microrganismos (SHI et al., 2015; DE PRISCO et al., 2015; COGHETTO; BRINQUES; AYUB, 2016b), como pode ser demonstrado nos resultados. Poucos trabalhos na literatura utilizam dessa tecnologia para o encapsulamento. Entre eles, no uso com microrganismos destacam-se De Prisco et al. (2015), que microencapsularam *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 em alginato e quitosana-alginato. Da mesma forma, não encontraram diferença na viabilidade dos microrganismos após o processamento. Ainda, Martoni et al. (2008) encapsularam *L. reuteri* com alginato de sódio e Shi et al. (2013) encapsularam *L. bulgaricus* com carragena e leite, ambos relataram a proteção das células encapsuladas quando expostas a condições adversas.

#### 5.4.3.2 Sobrevivência dos encapsulados obtidos através da extrusão por tecnologia de vibração ao armazenamento

Os encapsulados de Al-Pc-SQ e Al-Pc-PS de *L. plantarum* ATCC 8014, *L. paracasei* ML33 e *L. pentosus* ML 82 foram armazenadas a 4 °C em tampão fosfato (10 mM pH 7,4) e avaliadas quanto a sobrevivência por um período de 28 dias. Os resultados são demonstrados na Figura 15.

Figura 15. Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL<sup>-1</sup>) obtidos através da extrusão por tecnologia de vibração ao armazenamento



—x— Isolado livre; —o— Al-Pc-SQ; —Δ— Al-Pc-PS; (a) Encapsulados de *L. plantarum* ATCC 8014; (b) Encapsulados de *L. paracasei* ML33; (c) Encapsulados de *L. pentosus* ML82. Média (desvio padrão), n=3.

De acordo com os resultados, os encapsulados mantiveram-se estáveis ao longo do período de 28 dias de armazenamento, para todos os isolados estudados, com viabilidade acima de 7 log UFC.mL<sup>-1</sup>. Em todos os casos, a combinação Al-Pc-SQ mostrou-se mais eficiente na proteção dos microrganismos, provavelmente pela constituição do soro de queijo, que apresenta proteínas que reforçam a rede formada entre os polímeros aplicados, tornando o encapsulado mais resistente (SHI et al., 2013). Para *L. plantarum* (Figura 15a), uma redução de 0,65 ciclo log foi observada para combinação Al-Pc-SQ e 1,03 ciclos log para Al-Pc-PS. Quando comparado com o microrganismo livre, esse apresentou o dobro e o triplo de redução, respectivamente. Já o isolado *L. paracasei* ML33 (Figura 15b) apresentou os melhores resultados de viabilidade, sendo que os encapsulados de Al-Pc-SQ não apresentaram redução na viabilidade bacteriana, enquanto os encapsulados de Al-Pc-PS apresentaram uma pequena redução de 0,61 ciclos log. Por fim, o isolado *L. pentosus* ML82 (Figura 15c) apresentou redução de 0,43 ciclos log para encapsulados de Al-Pc-SQ, e o triplo, 1,29 ciclos log, para Al-Pc-PS. Em ambos, a redução da viabilidade dos encapsulados com permeado foram semelhantes as da célula livre.

Resultado e condições semelhantes foram descritas por SHI et al. (2013), ao encapsularem *L. bulgaricus* em esferas de alginato-leite seguida de armazenamento a 4 °C. Os autores relatam que as cápsulas apresentaram excelente viabilidade, em um período de 30 dias, com a mesma contagem inicial, de 10 log UFC.g<sup>-1</sup>. Células não encapsuladas foram utilizadas como controle, e neste caso, uma redução de 7,7 log UFC.g<sup>-1</sup> foi observada, indicando que a combinação de alginato-leite foi essencial na manutenção da viabilidade do microrganismo.

Sathyabama e Vijayabharathi (2014) microencapsularam *Staphylococcus succinus* (MAbB4) e *Enterococcus fecium* (FIdM3) com alginato de sódio misturado com dois agentes prebióticos, e avaliaram a sobrevivência desses encapsulados ao longo de 35 dias a 4 °C. Eles observaram que as bactérias encapsuladas apresentaram uma menor perda na viabilidade, em média 10%, quando comparados aos microrganismos livres que apresentaram uma redução em torno de 25%. Novamente, os autores relatam que a combinação de alginato e prebióticos contribuiu na manutenção das células.

Os resultados encontrados na maioria dos estudos corroboram com os descritos nesse trabalho, enfatizando que a aplicação de compostos adicionais ao

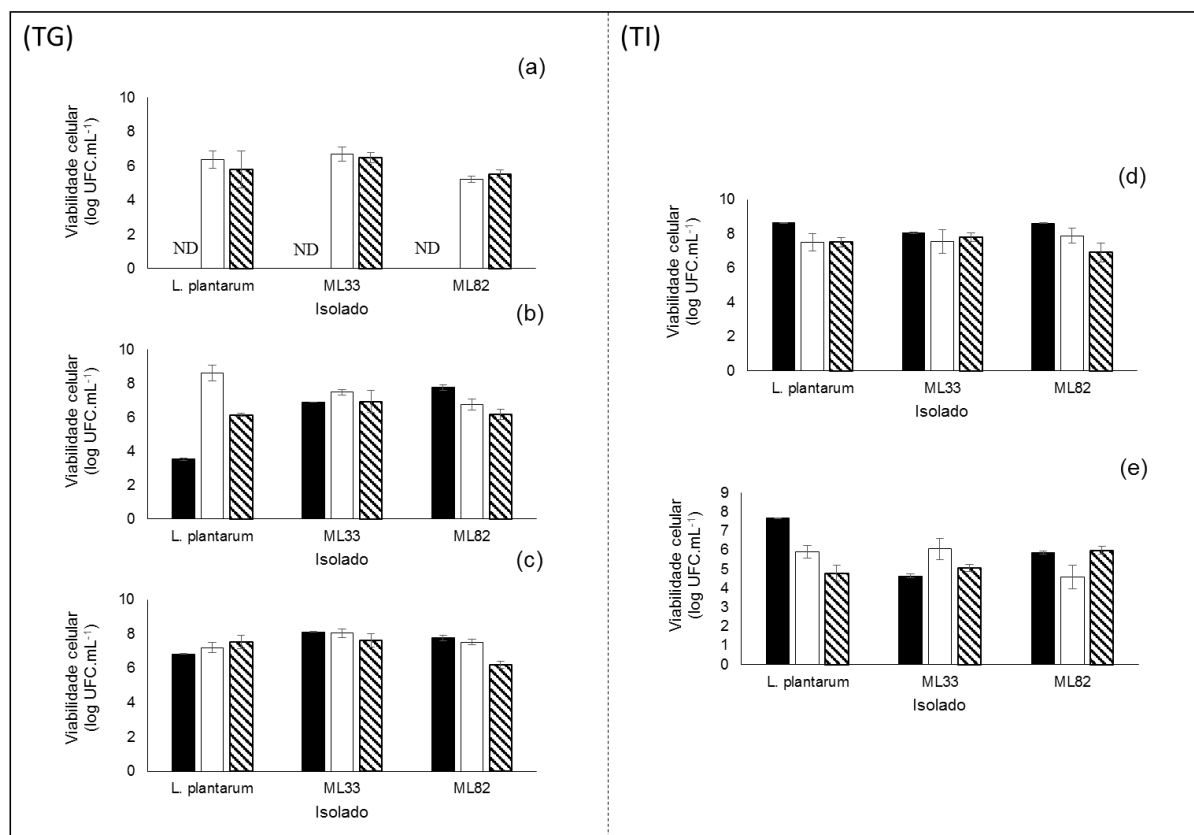


alginato é necessária para manter a viabilidade dos microrganismos encapsulados. Os soros lácteos aplicados apresentaram potencial na proteção dos isolados ao armazenamento, demonstrando que os alginatos podem formar complexos fortes com outros polímeros naturais, principalmente se combinado com proteínas que reforçam sua rede de proteção ao encapsulado.

#### **5.4.3.3 Sobrevivência dos encapsulados obtidos através da extrusão por tecnologia de vibração ao trato gastrointestinal simulado**

A fim de exercer efeitos benéficos no hospedeiro, os microrganismos devem resistir as condições adversas do TGI, sendo o encapsulamento uma das propostas para o aumento da resistência. Sendo assim, a viabilidade de *L. plantarum* ATCC 8014, *L. paracasei* ML33 e *L. pentosus* ML 82 livre, bem como as microcápsulas Al-Pc-SQ e Al-Pc-PS de cada um dos isolados foram avaliadas logo após o processo, quanto a sobrevivência ao TGI simulado, e estão descritos na Figura 16.

Figura 16. Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL<sup>-1</sup>) obtidos através da extrusão por tecnologia de vibração na exposição ao trato gastrointestinal simulado



TG (Trato gástrico): Suco gástrico durante 180 minutos (a) pH 2, (b) pH 2,5 e (c) pH 3; TI (trato intestinal): Suco intestinal durante 240 minutos (d) sem sais biliares e (e) com 0,5 % (m/v) de sais biliares. ■ Isolado livre; □ AI-Pc-SQ; ▨ AI-Pc-PS. <sup>a-d</sup> Média (desvio padrão), n=3. ND = Não detectado.

Os resultados demonstram que os isolados livres foram muito mais sensíveis às condições do trato gástrico, na incubação de 3 mg.mL<sup>-1</sup> de pepsina na exposição ao pH 2 (Figura 16a). Neste caso, nenhum microrganismo resistiu as condições de incubação. De acordo com SULTANA et al (2000), algumas cepas de *Lactobacillus* não conseguem sobreviver a condição de baixos pHs, pois este inibe a atividade metabólica do microrganismo, reduzindo, consequentemente, sua viabilidade. Porém, as células encapsuladas mostraram-se eficientes na proteção, com uma redução em torno de 3 ciclos log e sobrevivência acima de 6 log UFC.mL<sup>-1</sup> indiferente do material de parede a ser aplicado.

Nas condições de pH 2,5 e 3 (Figura 16b-c), há um aumento na viabilidade dos isolados livres expostos ao trato gástrico, sendo mais acentuada com o aumento do

pH, e redução em torno de 2 e 3 ciclos log, respectivamente. Ainda assim, as microcápsulas apresentaram maior eficiência na proteção às condições adversas quando comparada a célula livre, sendo que a combinação Al-Pc-SQ forneceu maior proteção. Esse resultado provavelmente se deve as proteínas presentes no soro de queijo, que apresentam maior potencial de proteção, quando comparado ao permeado, constituído principalmente de lactose (HUGO; BRUNO; GOLOWCZYC, 2016). A proteção fornecida pelos materiais encapsulantes é efeito da formação de uma densa rede entre o hidrogel e os constituintes do soro, que reduzem a taxa de difusão de compostos nas microesferas (SHI et al., 2013). Diversos estudos reportam que a maioria dos microrganismos probióticos são facilmente danificados quando expostos às condições ácidas estomacais. Desta forma, o encapsulamento com proteínas do soro apresentam uma excelente barreira ao baixo pH, contribuindo na alta sobrevivência de microrganismos encapsulados com matrizes de hidrocolóides, como alginato e pectina (GUÉRIN; VUILLEMARD; SUBIRADE, 2003; SHI et al, 2013).

Já para a simulação ao trato intestinal (Figura 16d-e), foi realizada a incubação de 1 mg.mL<sup>-1</sup> de pancreatina a pH 8, com ou sem adição de 0,5% (m/v) sais biliares. Na ausência de sais biliares (Figura 16d) há uma redução de 1 ciclo log em todos os encapsulados e para ambos materiais de parede. Já na presença de 0,5% (m/v) de sais biliares (Figura 16e), essa redução é mais pronunciada, com 4 ciclos log de redução.

Ainda, os isolados *L. paracasei* ML33 e *L. pentosus* ML82 testados apresentaram resultados semelhantes ao controle aplicado (*L. plantarum*) na viabilidade ao TGI, indicando que esses microrganismos selecionados apresentam uma boa alternativa de potencial de aplicação em alimentos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Ding e Shah (2007), que microencapsularam 8 cepas de bactérias probióticas com alginato de sódio por emulsão e avaliaram a sobrevivência dos microrganismos ao TGI simulado. Os encapsuladas foram expostas ao trato gástrico, onde uma redução de 4 ciclos log foi observada. Quando expostas ao trato intestinal, da mesma forma, uma redução de 4 ciclos log foi encontrada.

De Prisco et al. (2015) microencapsularam *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 por tecnologia de vibração, utilizando alginato de sódio como material protetor, sendo essa revestida por uma camada de quitosana. Quando expostas ao TGI simulado, as

cápsulas compostas somente por alginato apresentaram uma maior redução na viabilidade (0,35 ciclos log). Isto indica que é necessário uma combinação com outros compostos visando melhorar seu efeito protetor, como desenvolvido nesse trabalho.

Os resultados de viabilidade dos microrganismos encapsulados podem variar devido aos seus diversos parâmetros aplicados, como a cepa utilizada, os diferentes materiais encapsulantes e suas concentrações aplicadas, e a metodologia empregada. Torna-se essencial a escolha de materiais encapsulantes que melhorem a estabilidade da cápsula, protegendo o material sensível, além da influência do método escolhido para sua formação, quando se visa uma aplicação industrial. Todos esses fatores são relevantes assim na produção do encapsulado final.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento prévio do potencial de microrganismos isolados de uma região é imprescindível, quando objetiva-se a aplicação em produtos com características diferenciadas. A manutenção da viabilidade destes em condições adversas é de extrema importância, para a garantia de que atinjam o local de ação destinado em número suficiente para exercer um efeito positivo. Desta forma, a primeira barreira imposta é a passagem ao trato gastrointestinal, que no geral, leva a uma perda considerável na viabilidade celular pela exposição aos baixos níveis de pH do estômago e elevadas concentrações de sais biliares no intestino. Em vista disso, 109 bactérias isoladas de leite e queijo da região do Vale do Taquari foram estudadas quanto ao potencial de sobrevivência a passagem ao TGI simulado. Isso permitiu uma seleção de isolados em potencial, com altos níveis de viabilidade às condições ácidas e de alta concentração de sais, com valores superiores a 70% de sobrevivência em ambas condições.

Porém, microrganismos com características tecnológicas, até mesmo probióticos, podem apresentar baixa resistência ao TGI, necessitando de uma barreira externa como proteção. Desta forma, o encapsulamento de isolados selecionados foi realizado por duas técnicas distintas: *spray drying* e extrusão por tecnologia de vibração.

O microencapsulamento por *spray drying* aplicou soro de queijo, permeado de soro e retentado de soro como material encapsulante para proteção de *L. plantarum*

ATCC 8014. Soro de queijo e retentado de soro provaram ser os melhores materiais encapsulantes para proteger as células bacterianas da alta temperatura aplicada no processo. Quando armazenadas por 56 dias a 20 °C, ou inseridas em leite por 42 dias a 4 °C, as microcápsulas mantiveram alta viabilidade celular, com valores acima do determinado para aplicação em alimentos funcionais. Além disso, quando expostas a condições adversas do TGI, apresentaram melhores resultados de sobrevivência, com viabilidade acima de 8 CFU.mL<sup>-1</sup>. As microcápsulas formadas aparentemente não apresentaram diferenças na morfologia e diâmetro de  $7,0 \pm 1,0 \mu\text{m}$ .

No encapsulamento através da extrusão por tecnologia de vibração, soro de queijo e permeado de soro foram combinados com alginato de sódio e pectina, para proteção de *L. plantarum* ATCC 8014 e isolados *L. paracasei* ML33 e *L. pentosus* ML82. Não houve perda na viabilidade dos microrganismos após o processo, confirmando que o método é adequado na aplicação de células vivas. Ainda, quando armazenadas por 28 dias a 4 °C, apresentaram uma perda de apenas 1 ciclo log, indiferente de isolado ou material encapsulante aplicado. Além de terem fornecido proteção na exposição ao TGI simulado, sendo o soro de queijo o material que apresentou melhor efeito protetor, melhorando as condições de viabilidade na exposição a baixos pHs e presença de sais biliares.

Os dois métodos de encapsulamento aplicados, *spray drying* e extrusão por tecnologia de vibração, não afetaram a viabilidade dos microrganismos na produção das microcápsulas. De forma geral, os soros lácteos utilizados como materiais encapsulantes forneceram proteção aos mesmos, sendo o soro de queijo e retentado de soro com maior efeito protetor, quando comparado ao permeado de soro. Entretanto, a extrusão por tecnologia de vibração necessita de uma combinação de materiais com efeito gelificante para promover a formação do encapsulado, enquanto que para o *spray drying* os soros podem ser aplicados diretamente. Além disso, o produto oriundo da extrusão necessita de uma etapa adicional de remoção de água, o que demanda custo, sendo que o processo de *spray drying* já produz as cápsulas à seco. Neste caso, há uma facilidade no armazenamento e manutenção de produtos obtidos. Ainda, a técnica de extrusão por tecnologia de vibração possui a dificuldade de aumento de escala, sendo o processo de *spray drying* mais adequado para a aplicação industrial.

Por fim, os resultados deste trabalho demonstraram que diversas bactérias isoladas da região apresentam potencial para aplicação em produtos alimentícios, pela alta viabilidade quando expostas ao TGI. Ainda, quando pouco resistentes, podem ser protegidas por processos de encapsulamento, que formam uma barreira externa aprisionando e protegendo esses microrganismos. Neste caso, soros lácteos são promissores no uso como materiais encapsulantes, além de uma alternativa a fim de minimizar a quantidade descartada como resíduo pelos laticínios. Isso diminui o custo que demanda o seu tratamento, dando a esses soros uma nova aplicabilidade no desenvolvimento de produtos com valor agregado.

Assim se torna imprescindível o desenvolvimento de trabalhos futuros visando explorar cada vez mais as características e o potencial das bactérias lácticas isoladas da região do Vale do Taquari, visando sua aplicação industrial e tecnológica. Outro aspecto importante é a contribuição no bem-estar e saúde de quem os consome, por se tratar da ingestão de microrganismos com potencial probiótico.

Sendo assim, a continuidade da pesquisa envolverá:

- Avaliação da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias das BALs em células de adenocarcinoma humano Caco-2 por citometria de fluxo;
- O encapsulamento de BALs isoladas da região por *spray drying*;
- A aplicação de outros soros lácteos, como bubalino e caprino como material de parede, e avaliação do potencial de proteção no encapsulamento por *spray drying* e extrusão por tecnologia de vibração;
- A aplicação dos encapsulados em diferentes derivados lácteos, avaliando a viabilidade celular e a acidificação quando inseridos em produtos alimentares;
- A exposição dos encapsulados ao calor, mimetizando condições envolvidas no processo produtivo de alimentos.

## REFERÊNCIAS

ANVISA. Disponível em:

<[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm#](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm#)> Acesso em: 18 ago. 2016, 2008.

ALVES, M.; PERES, C. M.; HERNANDEZ-MENDONZA, A.; BRONZE, M. R.; PERES, C.; MALCATA, F. X. Olive paste as vehicle for delivery of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* 33. **Food Research International**. 75, p. 61–70, 2015.

ALVES, M.S. Microencapsulação de bactérias lácticas com potencial probiótico para produção de pasta de azeitona. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de ciências e tecnologia. Universidade Nova de Lisboa, 2013.

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. (2010). **Cultivo celular**, Fiocruz, 2010.

ANAL, A. K.; STEVENS, W. F. Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**. 290, p. 45-54, 2005.

ANAL, A.K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Foods Science & Technology**. v.18, n 5, p. 240-251, 2007.

AOAC. Official methods of analysis of AOAC international. 19. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2012.

ARRIBAS, B.; GARRIDO-MESA, N.; PERÁN, L.; CAMUESCO, D.; COMALADA, M.; BAILÓN, E.; ...; ZARZUELO, A. The immunomodulatory properties of viable *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius* CECT5713 are not restricted to the large intestine. **European journal of nutrition**, 51(3), 365-374, 2012.



ARSLAN, S.; ERBAS, M.; TONTUL, I.; TOPUZ, A. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**. 63, p. 685 – 690, 2015.

AZEREDO, H. M. C. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara. v. 16, n. 1, p. 89-9, 2005.

BAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; WANG, S.; DONG, X.; WANG, Y.; ZHANG, H. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. **Food Control**. 21, p. 695–701, 2010.

BARBERI, C.; CAMPANA, S.; DE PASQUALE, C.; KHORASGANI, M. R.; FERLAZZO, G.; BONACCORSI, I. T cell polarizing properties of probiotic bacteria. **Immunology letters**, 168(2), 337-342, 2015.

BARBOSA, J.; BORGES, S.; TEIXEIRA, P. Selection of potential probiotic *Enterococcus faecium* isolated from Portuguese fermented food. **International Journal of Food Microbiology**. 191, p. 144–148, 2014.

BELGUESMIA, Y.; DOMENGER, D.; CARON, J.; DHULSTER, P.; RAVALLEC, R.; DRIDER, D.; CUDENNEC, B. Novel probiotic evidence of lactobacilli on immunomodulation and regulation of satiety hormones release in intestinal cells. **Journal of Functional Foods**, 24, 276-286, 2016.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; KOMES, D.; KARLOVIĆ, S.; DJAKOVIĆ, S.; ŠPOLJARIĆ, I.; MRŠIĆ, G.; JEŽEK, D. Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and psyllium. **Food chemistry**, 167, 378-386, 2015.

BIANCHI, M. A.; DEL RIO, D.; PELLEGRINI, N.; SANSEBASTIANO, G.; NEVIANI, E.; BRIGHENTI, F. A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. **Letters in applied microbiology**, 39(3), 301-305, 2004.

BOSCH, M.; FUENTES, M.C.; AUDIVERT, S.; BONACHERA, M. A.; PEIRO, S.; CUNÉ, J. *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529: probiotic candidates to reduce cholesterol levels. **Journal Science Food Agriculture**. v. 94, p. 803–809, 2014.

BUCHI. Ficha técnica Encapsulador B-395 Pro. Encapsulador B-390 / B-395 Pro. Technical data sheet. Disponível em: <[http://static1.buchi.com/sites/default/files/technical-data-pdf/B-390\\_B395Pro\\_Data\\_Sheet\\_en\\_B.pdf](http://static1.buchi.com/sites/default/files/technical-data-pdf/B-390_B395Pro_Data_Sheet_en_B.pdf)> Acesso em: 23 jun. 2016.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; CAILLIEZ-GRIMAL, C.; JEANDEL, C.; SCHER, J. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in microparticles: Influence of casein to whey protein ratio on bacterial survival during digestion. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. 19, p. 233–242, 2013.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**. 104, p. 467–483, 2011.

BURNS, P.; LAFFERRIERE, L.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J. Influence of dairy practices on the capacity of probiotic bacteria to overcome simulated gastric digestion. **International Journal of Dairy Technology**. Vol 67, n 3, 2014.

CANDELA, M.; PERNA, F.; CARNEVALI, P.; VITALI, B.; CIATI, R.; GIONCHETTI, P.; ... BRIGIDI, P. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. **International journal of food microbiology**, 125(3), 286-292, 2008.

CANDELA, M.; SEIBOLD, G.; VITALI, B.; LACHENMAIER, S.; EIKMANN, B. J.; BRIGIDI, P. Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to Caco-2 cells: competition between bifidobacteria and enteropathogens. *Research in microbiology*, 156(8), 887-895, 2005.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the total Environment**. p. 385 – 396, 2013.

CHEW, S. C.; TAN, C. P.; LONG, K.; NYAM, K. L. In-vitro evaluation of kenaf seed oil in chitosan coated-high methoxyl pectin-alginate microcapsules. **Industrial Crops and Products**, 76, 230-236, 2015.

COGHETTO, C. C.; BRINQUES, G. B.; AYUB, M. A. Z. Probiotics production and alternative encapsulation methodologies to improve their viabilities under adverse environmental conditions. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 1-15, 2016b.

COGHETTO, C. C.; FLORES, S. H.; BRINQUES, G. B.; AYUB, M. A. Z. Viability and alternative uses of a dried powder, microencapsulated *Lactobacillus plantarum* without the use of cold chain or dairy products. **LWT-Food Science and Technology**, 71, 54-59, 2016a.

CRAVIOTO, A.; GROSS, R.J.; SCOTLAND, S.M.; ROWE, B. An adhesive factor found in Strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile Enteropathogenic Serotypes. **Current Microbiology**. 3: 95-99, 1979. DARDIR, H.A. In vitro Evaluation of Probiotic Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated From Novel Probiotic Dairy Products. **Global Veterinaria**. 8 (2), p. 190-196, 2012.

DARDIR, H.A. In vitro Evaluation of Probiotic Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated From Novel Probiotic Dairy Products. **Global Veterinaria**. 8 (2), p. 190-196, 2012.

DE CASTRO-CISLAGHI, F. P.; SILVA, C.R.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; LORENZ, J. G.; SANT'ANNA, E. S. Bifidobacterium Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**. 113, p.186–193, 2012.

DE PRISCO, A.; MARESCA, D.; ONGENG, D.; MAURIELLO, G. Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. **LWT - Food Science and Technology**. 61, p. 452 – 462, 2015.

DE VOS, P.; FAAS, M. M.; SPASOJEVIC, M.; SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, 20(4), 292-302, 2010.

DEL GAUDIO, P.; COLOMBO, P.; COLOMBO, G.; RUSSO, P.; SONVICO, F. Mechanisms of formation and disintegration of alginate beads obtained by prilling. **International Journal of Pharmaceutics**. 302 p. 1–9, 2005.

DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, G. P.; ALLESINA, S.; BARBA, M.; DEIDDA, F.; LORENZINI, P.; BALLARÉ, M.; MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; CAPURSO, L. Probiotics: from research to consumer. **Digestive and Liver Disease**, 38, S248-S255, 2006.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, London, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. **Journal of food science**, 72(9), M446-M450, 2007.

DUONGTHINGOC, D.; GEORGE, P.; KATOPO, L.; GORCZYCA, E.; KASAPIS, S. Effect of whey protein agglomeration on spray dried microcapsules containing *Saccharomyces boulardii*. **Food chemistry**, 141(3), 1782-1788, 2013.

EL-SALAM, M. H. A.; EL-SHIBINY, S. Preparation and properties of milk proteins-based encapsulated probiotics: a review. **Dairy Science & Technology**, 95(4), 393-412, 2015.

EMATER. Disponível em :<  
<http://www.emater.tche.br/site/regionais/lajeado.php#.VkHv0rerTIU>> Acesso em: 12/08/2016.

ERKKILA, S.; PETAJA, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**. v. 55, p. 297- 300, 2000.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. **Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization**. London, Ontario, Canada, 2002.

FAREEZ, I. M.; LIM, S. M.; MISHRA, R. K.; RAMASAMY, K. Chitosan coated alginate–xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. **International Journal of Biological Macromolecules**. 72, p.1419–1428, 2015.

FENG, J.; LIU, P.; YANG, X.; ZHAO, X. Screening of immunomodulatory and adhesive *Lactobacillus* with antagonistic activities against *Salmonella* from fermented vegetables. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 31(12), 1947-1954, 2015.

FOLIGNÉ, B.; PARAYRE, S.; CHEDDANI, R.; FAMELART, M. H.; MADEC, M. N.; PLÉ, C.; ...; DEUTSCH, S. M. Immunomodulation properties of multi-species fermented milks. **Food microbiology**, 53, 60-69, 2016.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 66, 365–378, 1989.

GARCIA, E.; LUCIANO, W.; XAVIER, D.; DA COSTA, W.; OLIVEIRA, K. D. S.; FRANCO, O. L.; ...; SAARELA, M. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. **Frontiers in Microbiology**, 7, 1371, 2016.

GARCÍA-CEJA, A.; MANI-LOPEZ, M.; PALOU, E.; LOPEZ-MALO, A. Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan. **LWT - Food Science and Technology**. 63, p. 482-489, 2015.

GOPAL, P. K.; PRASAD, J.; SMART, J.; GILL, H. S. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. **International journal of food microbiology**, 67(3), 207-216. 2001.

GUÉRIN, D.; VUILLEMARD, J. C.; SUBIRADE, M. Protection of bifidobacteria encapsulated in polysaccharide-protein gel beads against gastric juice and bile. **Journal of Food Protection**, 66(11), 2076-2084, 2003.

HERMANN, G.; FUNCK, G. D.; SCHMIDT, J. T.; PEREIRA, J. Q.; BRANDELLI, A.; RICHARDS, N. S. P. S. Evaluation of probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from artisan cheese. **Journal of Food Safety**. 34, p. 380–387, 2014.

HUGO, A. A.; BRUNO, F.; GOLOWCZYK, M. A. Whey permeate containing galactooligosaccharides as a medium for biomass production and spray drying of *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. **LWT-Food Science and Technology**, 69, 185-190, 2016.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da Produção Pecuária**, 2016.

IKEDA, D. M.; WEINERT JR., E.; CHANG, K. C. S.; MCGINN, J. M.; MILLER, S. A.; KELIIHOOMALU, C.; DUPONTE, M. W. Natural Farming: Lactic Acid Bacteria. University of Hawai. College of Tropical Agriculture and Human Resource. **Sustainable Agriculture**. v. 8, 2013.

ILHA, E. C.; SILVA, T.; LORENZ, J. G.; ROCHA, G. O. SANT'ANNA, E. S. *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. **European Food Research Technology**. 240, p. 977–984, 2015.

IRAVANI, S.; KORBOKANDI, H.; MIRMOHAMMADI, S. V. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. **Journal of Food Science and Technology**, 2014.

JANTZEN, M.; GÖPEL, A.; BEERMANN, C. Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. **Journal of Applied Microbiology**. 115, p. 1029—1036, 2013.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6 ed. Maryland, Aspen Publishers, 2000.

JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. 153, p. 216–222, 2012.

JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; DE PAULA, A. T.; SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; PENNA, A. L. B. Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Water-Buffered Mozzarella Cheese. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. 6, p. 141–156, 2014.

KASSAA, I. A.; HOBER, D.; HAMZE, M.; CHIHIB, N. E.; DRIDER, D. Antiviral Potential of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. v. 6, p. 177–185, 2014.

KENT, R. M.; DOHERTY, S. B. Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. **Food Research International**. 64, p. 567–576, 2014.

KEOGH, M. K.; O'KENNEDY, B. T. Milk fat microencapsulation using whey proteins. **International Dairy Journal**. 9, p. 657 - 663, 1999.

KHEM, S., SMALL, D. M., & MAY, B. K. The behaviour of whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum*. **Food chemistry**, 190, 717-723, 2016.

KIM, I. H.; PARK, M. S.; JI, G. E. Characterization of adhesion of *Bifidobacterium* sp. BGN4 to human enterocyte-like Caco-2 cells. **Journal of microbiology and biotechnology**, 13(2), 276-281, 2003.

KIM, S. J.; CHO, S. Y.; KIM, S. H.; SONG, O. J.; SHIN, I. S.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **LWT-Food Science and Technology**, 41(3), 493-500, 2008.

KRUNIĆ, T. Ž.; OBRADOVIĆ, N. S.; BULATOVIĆ, M. L.; VUKAŠINOVIĆ-SEKULIĆ, M. S. TRIFKOVIĆ, K. T.; RAKIN, M. B. Impact of carrier material on fermentative activity of encapsulated yoghurt culture in whey based substrate. **Hemijska industrija**, (00), 16-16, 2016.

LAVARI, L.; PÁEZ, R.; CUATRIN, A.; REINHEIMER, J.; VINDEROLA, G. Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli. **Journal of dairy research**, 81(03), 267-274, 2014.

LAVARI, L.; IANNIELLO, R.; PÁEZ, R.; ZOTTA, T.; CUATRIN, A.; REINHEIMER, J.; PARENTE, E.; VINDEROLA, G. Growth of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in whey permeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying. **LWT-Food Science and Technology**, 63(1), 322-330, 2015.

LEBEER, S.; CLAES, I.; TYTGAT, H. L.; VERHOEVEN, T. L.; MARIEN, E.; VON OSSOWSKI, I.; ...; VANDERLEYDEN, J. Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. **Applied and environmental microbiology**, 78(1), 185-193, 2012.

LEE, K. I.; HEO, T. R. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. **Applied and Environmental Microbiology**. v 66, p. 869–873, 2000.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Colloid & Interface Science**. 15, p. 73–83, 2010.

MACIEL, G. M.; CHAVES, K. S.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science**. v. 97, n 4, 2014.

MARTÍN, M. J.; VILLOSLADA, F. L.; RUIZ, M. A.; MORALES, M. E. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. 27, p. 15–25, 2015.

MARTONI, C.; BHATHENA, J.; URBANSKA, A. M.; PRAKASH, S. Microencapsulated bile salt hydrolase producing *Lactobacillus reuteri* for oral target delivery in the gastrointestinal tract. *Applied microbiology and biotechnology*. 81, p. 225 – 233, 2008.

MAZZITELLI, S.; TOSI, A.; BALESTRA, C.; NASTRUZZI, C. Production and Characterization of Alginate Microcapsules Produced by a Vibrational Encapsulation Device. **Journal of Biomaterials Applications**. v. 23, 2008.

MEIRA, S. M. M.; HELFER, V.T.; VELHO, R.V.; LOPES, F.C.; BRANDELLI, A. Probiotic potential of lactobacillus spp. Isolated from Brazilian regional ovine cheese. **Journal of Dairy Research**. v. 79, p. 119–127, 2012.

MOLLEA, C.; MARMO, L.; BOSCO, F. Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. **INTECH Open Access Publisher**, 2013.

MONTEAGUDO-MERA, A.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L.; RÚA, J.; MARTÍNEZ-BLANCO, H.; NAVASA, N.; GARCÍA-ARMESTO, M. R.; FERRERO, M. A. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **Journal of functional foods**. v. 4, p. 531-541, 2012.

NEMETHOVA, V.; LACIK, I.; RAZGA, F. Vibration Technology for Microencapsulation: The restrictive role of viscosity. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**. v. 5:1, 2014.

OKURO, P. K.; MATOS JR., F. E.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Technological Challenges for Spray Chilling Encapsulation of Functional Food Ingredients. **Food Technology and Biotechnology** 51 (2), p. 171–182, 2013.

ÖZER, B.; KIRMACI, H. A.; ŞENEL, E.; ATAMER, M.; HAYALOĞLU, A. Improving the viability of Bifidobacterium bifidum BB-12 and Lactobacillus acidophilus LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. **International Dairy Journal**, 19(1), 22-29, 2009.

PANKASEMSUK, T.; APICHARTSRANGKON, A.; WORAMETRACHANON, S.; TECHARANG, J. Encapsulation of Lactobacillus casei 01 by alginate along with hi-maize starch for exposure to a simulated gut model. **Food Bioscience**, 16, 32-36, 2016.

PIENIZ, S.; ANDREAZZA, R.; ANGHINONI, T.; CAMARGO, F.; BRANDELLI, A. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of Enterococcus durans strain LAB18s. **Food Control**. 37, p. 251 – 256, 2014.

PIMENTEL-GONZÁLEZ, D. J.; CAMPOS-MONTIEL, R.G.; LOBATO-CALLEROS, C.; PEDROZA-ISLAS, R.; VERNON-CARTER, E.J. Encapsulation of Lactobacillus rhamnosus in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**. 42, p. 292–297, 2009.

PINTO, S. S.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; BENEDETTI, S.; MURAKAMI, F. S.; PETRUS, J. C. C.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C. Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect Bifidobacterium-BB-12 microencapsulated by spray drying. **Food Research International**. 67, p. 400–408, 2015.

RANADHEERA, C.S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S.K. Effect of dairy probiotic combinations on in vitro gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. **Journal of Functional Foods**. v. 8, p.18–25, 2014.

RATHORE, S.; DESAI, P. M.; LIEW, C. V.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, 116(2), 369-381, 2013.

REN, D.; LI, C.; QIN, Y.; YIN, R.; DU, S.; YE, F.; ... SUN, Y. In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. **Anaerobe**, 30, 1-10, 2014.

RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GEBARA, C.; INFANTE, F. N. S.; GROSSO, C.R.F.; GIGANTE, M. L. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**. 66, p. 424–431, 2014.

RIEDEL, C. U.; FOATA, F.; GOLDSTEIN, D. R.; BLUM, S.; EIKMANN, B. J. Interaction of bifidobacteria with Caco-2 cells—adhesion and impact on expression profiles. **International journal of food microbiology**, 110(1), 62-68, 2006.

RIVEROS, B.; FERRER, J.; BORQUEZ, R. Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus*. **Drying Technology**, 27(1), 123-132, 2009.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digest Liver Diseases Journal**. v. 34, 2002.

RODRIGUES, D.; SOUSA, S.; ROCHA-SANTOS, T.; SILVA, J. P.; LOBO, J. S.; COSTA, P.; AMARAL, M. H.; PINTADO, M. M.; GOMES, A. M.; MALCATA, F. X.; FREITAS, A. C. Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. **International Dairy Journal**, 21(11), 869-876, 2011.

ROKKA, S.; RANTAMÄKI, P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. **European Food Research and Technology**. v. 231, p. 1–12, 2010.

RUBIO, R. JOFRÉ, A. MARTÍN, B. AYMERICH, T. GARRIGA, M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. **Food Microbiology** v. 38, p. 303 – 311, 2014.

RYAN, K. A.; JAYARAMAN, T.; DALY, P.; CANCHAYA, C.; CURRAN, S.; FANG, F.; QUIGLEY, E. M.; O'TOOLE, P. W. Isolation of lactobacilli with probiotic properties from the human stomach. The Society for Applied Microbiology, **Letters in Applied Microbiology**. 47, p. 269–274, 2008.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prébióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n 1, 2006.



SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**. v 84, p. 197–215, 2000.

SAITO, V. S. T.; SANTOS, T. F.; VINDEROLA, C. G.; ROMANO, C.; NICOLI, J. R.; ARAÚJO, L. S.; COSTA, M. M.; ANDRIOLI, J.L.; UETANABARO, A. P.T. Viability and Resistance of Lactobacilli Isolated from Cocoa Fermentation to Simulated Gastrointestinal Digestive Steps in Soy Yogurt. **Journal of Food Science**. v. 79, n 2, 2014.

SANDOVAL-CASTILLA, O.; LOBATO-CALLEROS, C.; GARCÍA-GALINDO, H. S.; ALVAREZ-RAMÍREZ, J.; VERNON-CARTER, E. J. Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped Lb. casei in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **Food Research International**, 43(1), 111-117, 2010.

SARKAR, A.; MANDAL, S. Bifidobacteria—Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. **Microbiological Research**, 192, 159-171, 2016.

SATHYABAMA, S; VIJAYABHARATHI, R. Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. **LWT-Food Science and Technology**, 57(1), 419-425, 2014.

SCHELL, D.; BEERMANN, C. Fluidized bed microencapsulation of Lactobacillus reuteri with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastrointestinal survival. **Food Research International**. 62, p. 308–314, 2014.

SHI, L.; LI, Z.; ZHANG, Z.; ZHANG, T.; YU, W.; ZHOU, M.; TANG, Z. Encapsulation of Lactobacillus bulgaricus in carrageenan-locust bean gum coated milk microspheres with double layer structure. **LWT - Food Science and Technology** 54, p.147 – 151, 2013.

SISO, G. M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 57, p. 1-11, 1996.

SLUKOVÁ, M.; HINKOVÁ, A.; HENKE, S.; SMRŽ, F.; LUKAČÍKOVÁ, M.; POUR, V.; BUBNÍK, Z. Cheese whey treated by membrane separation as a valuable ingredient for barley sourdough preparation. **Journal of Food Engineering**, 172, 38-47, 2016.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins – From ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**. 18, p. 695 – 704, 2008.

SMITHERS, G. W. Whey-ing up the options—Yesterday, today and tomorrow. **International Dairy Journal**, 48, 2-14, 2015.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SPIER, M.R.; MEDEIROS, A. B. P.; YAMAGUISHI, C.T.; LINDNER, J. D.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. The Potential of Probiotics: A Review. **Food Technology Biotechnology**. v. 48, p. 413–434, 2010.

SOUKOULIS, C.; BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S.; YONEKURA, L.; PARMENTER, C.; FISK, I. Impact of Milk Protein Type on the Viability and Storage Stability of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 Using Spray Drying. **Food Bioprocess Technology**. 7, p. 1255–1268, 2014.

SU, L.; LIN, C.; CHEN, M. Development of an Oriental-style dairy product coagulated by microcapsules containing probiotics and filtrates from fermented rice. v 60, n 1. **International Journal of Dairy Technology**, 2007.

SULTANA, K; GODWARD, G; REYNOLDS, N; ARUMUGASWAMY, R; PEIRIS, P; KAILASAPATHY, K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. **International Journal Food Microbiology** 62:47–55, 2000.

SUNOHARA, H.; OHNO, T.; SHIBATA, N.; SEKI, K. Process for producing capsule and capsule obtained thereby. Inventors and Morishita Jintan Co. Ltd. assignee. US Patent. p. 478-570, 1995.

TEE, W. F.; NAZARUDDIN, R.; TAN, Y. N.; AYOB, M. K. Effects of encapsulation on the viability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* exposed to high acidity condition and presence of bile salts. **Food Science and Technology International**. 20(6), p. 399–404, 2013.

TSAI, C. C.; LIANG, H. W.; YU, B.; HSIEH, C. C.; HWANG, C. F.; CHEN, M. H.; TSEN, H. Y. The relative efficacy of different strain combinations of lactic acid bacteria in the reduction of populations of *Salmonella enterica* Typhimurium in the livers and spleens of mice. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, 63(1), 44-53, 2011.

TULUMOĞLU, S.; KAYA, H. I.; ŞİMŞEK, O. Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese. **Anaerobe**. 30, p.120 – 125, 2014.

TUO, Y.; ZHANG, W.; ZHANG, L.; AI, L.; ZHANG, Y.; HAN, X.; I YI, H. Study of probiotic potential of four wild *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Anaerobe**. 21, p. 22 – 27, 2013.

UROIĆ, K.; NOVAK, J.; HYNÖNEN, U.; PIETILÄ, T. E.; PAVUNC, A. L.; KANT, R.; ... ŠUŠKOVIĆ, J. The role of S-layer in adhesive and immunomodulating properties of probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* D6 isolated from artisanal smoked fresh cheese. **LWT-Food Science and Technology**, 69, 623-632, 2016.

VANDERPOOL, C.; YAN, F.; POLK, D. B. Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. **Inflammatory bowel diseases**, 14(11), 1585-1596, 2008.

VARANKOVICH, N. V.; NICKERSON, M. T.; KORBER, D. R. Probiotic-based strategies for therapeutic and prophylactic use against multiple gastrointestinal diseases. **Frontiers in microbiology**, 6, 2015.

VIVEK, K. B. Use os encapsulated probiotics in dairy based foods. **International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences**. 3, p. 188-199, 2013.

WENRONG, S.; GRIFFITHS, M. W. Survival of bifidobacteria in yoghurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan–xanthan beads. **International Journal of Food Microbiology**. v 61, p. 17–25, 2000.

WHELEHAN, M.; MARIOSON, I. W. Microencapsulation using vibrating technology. **Journal of Microencapsulation**. 28, p. 669 – 688, 2011.

YOUNG, S. L.; SARDA, X.; ROSENBERG, M. Microencapsulating properties of whey proteins. 2. Combination of whey proteins with carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, 76(10), 2878-2885, 1993.

ZHANG, Y.; LIN, J.; ZHONG, Q. S/O/W emulsions prepared with sugar beet pectin to enhance the viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514. **Food Hydrocolloids**, 52, 804-810, 2016.

## ANEXO A

Avaliação da sobrevivência dos isolados expostos às condições ambientais do TGI.

Isolado	Suco gástrico**										Suco intestinal***								
	pH 2			pH 2,5				pH 3			0% sais biliares				0,5% sais biliares				
	T0	T3		T0	T3			T0	T3		T0	T4			T0	T4			
<i>L. acidophilus</i> *	8,32	0,21	0	8,58	0,02	5,11	0,00	8,57	0,01	7,39	0,02	8,63	0,06	8,63	0,01	8,63	0,05	8,98	0,98
<i>B. lactis</i> *	7,40	0,28	0	7,81	0,28	5,71	0,83	7,91	0,17	7,08	0,50	7,98	0,26	8,01	0,26	6,56	0,43	6,68	0,67
<i>L. paracasei</i> *	8,25	0,11	0	8,27	0,07	6,44	0,09	8,27	0,04	7,98	0,22	8,15	0,03	8,23	0,03	4,72	0,12	5,49	0,41
<i>L. plantarum</i> *	8,72	0,04	0	8,68	0,03	3,52	0,08	8,74	0,02	6,84	0,01	8,76	0,02	8,63	0,04	8,34	0,11	8,68	0,98
<i>L. rhamnosus</i> *	8,57	0,01	0	8,70	0,00	5,94	0,24	8,57	0,03	5,16	0,12	8,71	0,03	8,70	0,01	4,95	0,05	3,80	0,90
<i>L. casei</i> *	8,31	0,07	0	8,20	0,03	6,72	0,12	8,24	0,04	7,43	0,06	8,29	0,06	8,25	0,05	8,11	0,03	8,69	1,00

L. delbrueckii*	8,74	0,26	0	8,63	0,20	6,25	0,06	8,49	0,05	6,74	0,07	8,59	0,13	7,56	0,12	5,00	0,54	4,36	0,26
1	8,63	0,04	0	8,63	0,02	3,45	0,16	8,68	0,03	4,82	0,04	8,62	0,00	8,61	0,02	8,22	0,03	7,30	0,04
2	8,49	0,07	0	8,48	0,02	6,37	0,06	8,58	0,03	7,58	0,25	8,66	0,07	8,48	0,08	5,69	0,01	3,22	0,01
4	8,35	0,05	0	8,28	0,17	7,17	0,04	8,40	0,12	7,24	0,04	8,35	0,05	8,30	0,00	7,45	0,05	7,26	0,02
5	7,57	0,00	0	8,45	0,02	3,48	0,00	8,44	0,02	6,14	0,08	8,48	0,00	8,6	0,02	5,96	0,00	7,85	0,01
6	6,81	0,18	0	8,40	0,07	5,33	0,01	8,29	0,13	3,76	0,03	8,16	0,01	8,61	0,01	4,40	0,09	0	0
7	0	0,05	0	7,88	0,04	3,75	0,13	8,27	0,07	6,59	0,05	8,02	0,11	8,23	0,01	5,97	0,01	3,84	0,11
8	8,64	0,05	0	8,59	0,01	5,25	0,02	8,60	0,01	6,96	0,07	8,65	0,02	8,67	0,02	7,82	0,11	5,56	0,02
10	8,64	0,04	0	8,59	0,07	2,9	0,05	8,61	0,07	6,45	0,07	8,74	0,03	8,62	0,02	8,33	0,03	7,99	0,02
11	8,67	0,04	0	8,57	0,12	5,47	0,10	8,72	0,03	7,26	0,04	8,54	0,00	8,65	0,02	4	0,00	0	0
12	7,43	0,00	0	6,98	0,03	7,02	0,11	7,08	0,04	6,98	0,23	7,87	0,09	6,84	0,00	5,59	0,01	4,80	0,00
13	8,49	0,03	0	8,50	0,03	7,19	0,04	8,40	0,02	8,31	0,02	8,40	0,03	8,34	0,06	7,37	0,21	6,45	0,02
15	7,48	0,00	0	7,54	0,06	0	0	7,88	0,09	0	0	7,74	0,04	7,4	0,01	0	0	0	0
17	8,02	0,06	0	8,13	0,02	3,82	0,02	8,08	0,04	7,89	0,03	8,20	0,05	8,30	0,02	7,75	0,03	6,18	0,12
18	8,62	0,01	0	8,57	0,02	6,56	0,09	8,63	0,02	6,76	0,01	8,60	0,04	8,75	0,00	6,05	0,01	7,07	0,04
19	0	0	0	7,10	0,09	5,15	0,16	6,90	0,00	6,85	0,00	7,19	0,01	7,23	0,05	4,78	0,11	4,62	0,04
20	8,75	0,06	0	8,70	0,00	3,65	0,05	8,63	0,07	4,6	0,02	8,67	0,00	8,7	0,03	8,00	0,13	7,8	0,00
21	8,40	0,11	0	8,64	0,10	5,57	0,12	8,72	0,05	8,15	0,03	8,59	0,10	8,75	0,01	0	0	0	0
22	8,74	0,04	0	8,73	0,02	2,30	0,01	8,77	0,00	4,38	0,17	8,66	0,12	8,78	0,03	4,23	0,05	3,54	0,39
23	8,70	0,02	0	8,63	0,04	0	0	8,65	0,04	2,7	0,03	8,56	0,02	8,7	0,03	5,16	0,01	6	0,03
24	8,08	0,04	0	8,08	0,07	5,95	0,08	7,93	0,03	8,12	0,12	8,23	0,00	8,23	0,08	7,85	0,13	7,13	0,02
25	8,20	0,03	0	8,13	0,02	3,9	0,24	8,23	0,08	5,64	0,13	8,32	0,04	8,27	0,11	8,19	0,04	7,75	0,02
26	8,20	0,11	0	8,56	0,02	6,96	0,03	8,48	0,03	8,27	0,03	8,54	0,00	8,52	0,02	4,81	0,03	2,17	0,15
28	8,54	0,02	0	8,57	0,08	5	0,09	8,68	0,04	5,02	0,02	8,66	0,04	8,64	0,04	5,19	0,01	5,06	0,06
29 b	8,48	0,08	0	8,39	0,03	2,18	0,15	8,36	0,06	5,34	0,00	8,33	0,05	8,11	0,14	8,04	0,04	7,26	0,02

29p	8,45	0,03	0	8,57	0,07	3,59	0,20	8,59	0,03	7,37	0,12	8,62	0,06	8,24	0,06	7,54	0,07	4,81	0,04
30	8,63	0,03	0	8,56	0,11	6,45	0,01	8,52	0,07	7,87	0,05	8,64	0,09	8,48	0,02	7,26	0,10	3,06	0,02
31	7,98	0,06	0	7,98	0,02	5,86	0,04	7,92	0,00	4,24	0,11	7,85	0,00	7,74	0,03	7,74	0,01	7,10	0,02
32	8,45	0,10	0	8,55	0,03	6,11	0,26	8,52	0,05	7,98	0,02	8,45	0,05	8,51	0,03	8,19	0,01	5,17	0,04
33	8,42	0,04	0	8,59	0,13	6,88	0,00	8,48	0,00	8,11	0,02	8,53	0,10	8,05	0,04	4,46	0,05	4,64	0,10
34	8,48	0,02	0	8,44	0,01	5,13	0,19	8,55	0,02	6,88	0,00	8,45	0,15	8,27	0,06	8,33	0,16	0	0
36	8,24	0,11	0	8,10	0,12	6	0,09	8,22	0,04	6,72	0,10	8,27	0,01	8,45	0,25	0	0	0	0
37	8,56	0,03	0	8,69	0,00	3,24	0,09	8,59	0,06	7,63	0,09	8,60	0,01	8,56	0,00	0	0	0	0
38	6,88	0,09	0	6,25	0,20	6,06	0,00	6,70	0,09	6,28	0,00	6,74	0,12	6,15	0,02	5,45	0,07	3,85	0,05
39	8,59	0,01	0	8,59	0,02	2,81	0,26	8,40	0,03	7,32	0,00	8,19	0,41	8,54	0,01	3	0,00	2,40	0,09
40	5,88	0,01	0	5,88	0,04	2,81	0,10	5,47	0,20	4,97	0,09	5,87	0,02	5,79	0,02	5,95	0,01	5,74	0,12
41	8,37	0,10	0	8,48	0,06	5,75	0,02	7,77	0,08	7,17	0,06	7,24	0,09	7,95	0,03	4,41	0,40	6,78	0,09
42	8,46	0,00	0	8,45	0,03	2,6	0,42	8,60	0,07	7,37	0,23	8,53	0,06	8,51	0,01	3,18	0,01	2	0,03
43	8,70	0,08	0	8,54	0,04	6,76	0,04	8,71	0,05	8,06	0,05	8,69	0,00	8,55	0,04	8,31	0,01	3,54	0,03
44	5,33	0,09	0	6,95	0,05	0	0	7,04	0,17	4,94	0,02	6,81	0,10	6,78	0,07	6,93	0,03	6,45	0,02
46	8,54	0,06	0	8,60	0,05	6,90	0,05	8,84	0,08	7,11	0,07	8,84	0,06	6,91	0,11	8,33	0,02	7,15	0,04
47	8,02	0,11	0	8,35	0,08	3,22	0,04	8,23	0,02	3,68	0,11	8,12	0,02	7,88	0,07	0	0	0	0
47a	6,81	0,37	0	7,13	0,12	2,85	0,20	7,04	0,21	7,24	0,26	6,74	0,04	6,95	0,15	0	0	0	0
47b	8,59	0,02	0	8,63	0,01	3,32	0,04	8,58	0,03	4,09	0,09	8,25	0,10	7,96	0,08	8,51	0	2,30	0,24
48	8,47	0,05	0	8,64	0,01	3,92	0,08	8,42	0,22	7,83	0,20	8,57	0,00	8,7	0,06	3,18	0,15	0	0
50	7,24	0,11	0	7,91	0,09	3,46	0,01	8,22	0,00	6,53	0,01	8,17	0,12	7,26	0,05	0	0	0	0
50a	8,48	0,00	0	8,37	0,08	3,81	0,00	8,51	0,09	6,90	0,17	8,56	0,01	7,86	0,00	7,91	0,01	7,03	0,02
50b	0	0	0	8,39	0,02	3,81	0,03	8,57	0,15	6,61	0,32	8,63	0,09	8,29	0,18	0	0	0	0
51	8,27	0,01	0	8,81	0,05	6,20	0,00	8,83	0,04	7,90	0,03	8,84	0,00	8,83	0,05	5,52	0,01	6,20	0,17
52	8,56	0,03	0	8,54	0,03	7,18	0,00	8,58	0,06	8,16	0,01	8,56	0,04	8,54	0,06	0	0	0	0

53	8,42	0,01	0	8,51	0,01	2,88	0,15	8,46	0,01	7,16	0,11	8,41	0,04	8,22	0,25	0	0	0	0
55	8,52	0,02	0	8,40	0,02	0	0,04	8,61	0,13	3,54	0,05	8,46	0,05	8,46	0,01	0	0	0	0
56	8,56	0,03	0	8,06	0,02	4,17	0,01	8,45	0,01	6,56	0,20	8,48	0,16	8,61	0,03	0	0	0	0
57	8,41	0,02	0	8,45	0,02	3,38	0,07	8,29	0,01	7,54	0,04	8,44	0,02	8,51	0,03	3,40	0,09	3,04	0,00
58	8,37	0,03	0	8,40	0,04	3,41	0,00	8,59	0,02	4,06	0,02	8,65	0,01	7,70	0,09	6,65	0,15	3,98	0,02
59	8,53	0,26	0	8,66	0,03	0	0	8,61	0,01	6,43	0,00	8,65	0,00	8,51	0,04	3,70	0,00	0	0
60	8,46	0,00	0	8,54	0,06	5,76	0,05	8,52	0,07	6,36	0,00	8,60	0,05	8,52	0,14	4,60	0,00	2,18	0,15
61	7,38	0,15	0	8,51	0,30	0	0	7,41	0,20	6,22	0,02	8,11	0,18	8,44	0,04	0	0	0	0
62	8,44	0,09	0	8,55	0,01	2,00	0,01	8,62	0,01	4,04	0,00	8,65	0,02	8,06	0,10	8,56	0,12	2,70	0
64	7,77	0,31	0	8	0,04	8,03	0,06	7,88	0,09	8,09	0,01	8,31	0,14	8,28	0,07	7,43	0,09	2,78	0,00
65b	8,41	0,05	0	8,37	0,23	3,29	0,08	8,57	0,01	6,16	0,07	8,35	0,03	8,7	0,03	4,04	0,04	2,93	0,03
66	8,22	0,03	0	8,57	0,01	3,97	0,11	8,52	0,17	7,70	0,23	8,26	0,03	8,50	0,03	8,13	0,02	7,61	0,01
67	8,57	0,02	0	8,68	0,06	3,53	0,00	8,26	0,18	7,65	0,11	8,55	0,02	8,44	0,06	2	0,11	0	0
69	8,69	0,08	0	8,73	0,01	6,44	0,04	8,45	0,00	7,71	0,00	8,69	0,06	8,92	0,01	0	0	0	0
70	8,50	0,06	0	8,35	0,15	6,75	0,10	8,45	0,00	7,94	0,03	8,39	0,01	8,17	0,02	4,90	0,05	2,98	0,12
71	8,22	0,12	0	8,45	0,10	3,22	0,09	6,44	0,06	7,08	0,00	8,44	0,06	8,64	0,05	4,74	0,21	2	0
73	8,79	0,08	0	8,81	0,01	6,96	0,06	8,81	0,02	6,96	0,18	8,75	0,03	8,80	0,01	8,65	0,00	5,56	0,09
74	8,70	0,03	0	8,67	0,05	5,42	0,14	8,56	0,01	7,72	0,00	8,70	0,04	8,86	0,01	0	0	0	0
75B	8,68	0,01	0	8,70	0,03	3,57	0,04	8,67	0,02	7,04	0,06	8,63	0,08	8,3	0,07	5,25	0,23	5,55	0,18
75C1	8,45	0,01	0	8,57	0,04	3,23	0,08	8,67	0,02	0	0	8,53	0,02	8,61	0,01	4,18	0,15	1,7	0,03
75C2	8,30	0,04	0	8,23	0,03	4,6	0,11	8,42	0,04	8,04	0,00	8,31	0,12	7,93	0,03	5,28	0,12	0	0
76	7,32	0,22	0	8,60	0,05	5,4	0,00	8,83	0,03	7,51	0,21	8,72	0,02	8,66	0,07	5,73	0,05	0	0
78a	8,79	0,06	0	8,71	0,02	5,45	0,03	8,77	0,02	8,11	0,01	8,71	0,00	8,86	0,05	3,00	0,00	0	0
78b	8,37	0,12	0	8,2	0,08	3,41	0,14	8,62	0,01	7,99	0,24	8,67	0,02	8,67	0,03	6,02	0,04	0	0
80	7,91	0,01	0	8,40	0,07	3,80	0,04	8,40	0,05	6,60	0,18	8,51	0,01	8,49	0,01	7,56	0,01	3,77	0,09

82	8,66	0,06	0	8,79	0,09	7,77	0,17	8,69	0,01	7,77	0,17	8,77	0,01	8,62	0,02	7,38	0,19	5,87	0,09
88a	8,48	0,01	0	8,68	0,02	7,58	0,00	8,52	0,07	8,33	0,02	8,65	0,03	8,85	0,02	0,00	0	0	0
89	8,48	0,15	0	8,66	0,03	4,3	0,24	8,60	0,03	8,08	0,01	8,57	0,02	8,54	0,02	0,00	0	0	0
93p	8,45	0,02	0	8,51	0,03	0	0	8,63	0,04	7,01	0,00	8,59	0,02	8,39	0,04	4,00	0,00	0	0
98	8,54	0,01	0	8,71	0,07	3,83	0,63	8,62	0,05	6,8	0,26	8,51	0,13	8,51	0,07	7,45	0,05	5,54	0,06
99	8,62	0,01	0	8,57	0,05	3,49	0,60	8,63	0,01	4,7	0,09	8,56	0,01	8,45	0,02	4,18	0,05	2,48	0,00
103	8,45	0,02	0	8,26	0,12	1,7	0,07	8,31	0,12	6,06	0,10	8,24	0,01	8,27	0,22	7,86	0,00	6,78	0,15
104	8,29	0,08	0	8,27	0,04	2,4	0,30	8,29	0,15	5,82	0,28	8,31	0,01	7,99	0,17	7,60	0,04	5,38	0,02
107	8,37	0,05	0	8,44	0,06	4,48	0,15	8,40	0,02	7,02	0,01	8,36	0,04	8,5	0,01	8,45	0,02	8,09	0,02
108	8,72	0,00	0	8,85	0,13	6,23	0,38	8,45	0,15	8,08	0,00	8,81	0,05	8,85	0,02	3,65	0,27	0	0
109	8,54	0,06	0	8,59	0,02	0	0	8,43	0,03	7,22	0,60	8,69	0,05	8,37	0,01	3,95	0,62	0	0
112	8,48	0,04	0	8,54	0,02	3,18	0,06	8,57	0,02	5,45	0,06	8,59	0,04	8,45	0,03	6,93	0,03	5,74	0,01
113	8,33	0,05	0	8,56	0,00	3,33	0,18	8,53	0,01	6,46	0,51	8,50	0,05	8,5	0,02	6,78	0,15	4,98	0,02
114	8,02	0,02	0	7,96	0,17	5,73	0,05	7,97	0,15	6,62	0,00	8,16	0,11	8,01	0,18	4,65	0,15	3,41	0,07
115	7,33	0,15	0	7,43	0,00	2	0	7,33	0,30	2,4	0,30	7,38	0,00	6,78	0,07	6,60	0,11	5,49	0,00
116	8,65	0,02	0	8,59	0,01	5,61	0,02	8,58	0,02	8,10	0,14	8,57	0,01	8,58	0,06	6,90	0,17	5,06	0,02
117	8,55	0,11	0	8,60	0,01	4,65	0,21	8,42	0,02	8,41	0,09	8,60	0,03	8,48	0,03	8,37	0,15	8,04	0,09
118	8,40	0,02	0	8,45	0,03	7,76	0,21	8,41	0,00	6,82	0,02	8,39	0,10	7,96	0,02	7,8	0,00	6,24	0,15
119	7,85	0,20	0	8,16	0,01	0	0	8,15	0,13	6,34	0,08	8,10	0,05	8,23	0,03	0	0	0	0
120	8,43	0,33	0	8,06	0,01	2,3	0,04	8,24	0,04	5,38	0,00	8,32	0,06	8,27	0,16	0	0	0	0
121	8,53	0,04	0	8,04	0,02	7,08	0,01	7,97	0,09	7,74	0,05	8,48	0,01	8,64	0,08	4,42	0,02	7,27	0,00
123	8,16	0,01	0	8,47	0,04	0	0	8,45	0,02	6,45	0,07	8,55	0,01	8,53	0,03	8,07	0,30	4,05	0,02
124	8,40	0,04	0	7,99	0,03	7,53	0,02	8,52	0,18	7,76	0,38	8,38	0,02	7,95	0,05	3,40	0,09	3,69	0,21
129	7,95	0,05	0	8,23	0,00	1,7	0,02	8,36	0,00	5,38	0,00	8,45	0,01	8,35	0,15	1,70	0	0	0
130	8,29	0,01	0	8,31	0,05	1,7	0,07	8,31	0,14	5,81	0,18	8,39	0,04	8,26	0,05	7,40	0,19	3,7	0,02



131	7,12	0,02	0	8,60	0,14	7,01	0,07	8,61	0,08	7,96	0,17	8,60	0,08	7,88	0,09	8,61	0,02	7,42	0,04
132	8,51	0,13	0	8,57	0,04	7,28	0,01	8,55	0,08	8,16	0,02	8,61	0,05	8,76	0,00	0	0	0	0
133	8,24	0,01	0	8,24	0,01	4,31	0,02	8,28	0,02	6,94	0,01	8,33	0,09	8,31	0,05	5,31	0,03	2,23	0,03
134	8,63	0,02	0	8,58	0,06	2,93	0,33	6,52	0,03	5,93	0,26	8,65	0,05	8,70	0,07	7,79	0,06	6,84	0,03
135	7,93	0,03	0	7,73	0,01	6,61	0,00	7,61	0,01	7,40	0,08	8,20	0,02	8,28	0,03	5,42	0,06	5,52	0,04
136	8,20	0,00	0	8,24	0,01	5,15	0,33	8,19	0,07	7,43	0,07	8,19	0,10	8,32	0,04	8,11	0,03	7,84	0,05
137	8,37	0,03	0	8,42	0,02	2,85	0,03	8,41	0,03	6,5	0,05	8,48	0,09	8,41	0,03	7,60	0,00	6,78	0,07
138	8,59	0,01	0	8,41	0,02	0	0	8,47	0,08	5,81	0,12	8,45	0,05	8,5	0,01	8,44	0,01	8,03	0,02
139	8,16	0,02	0	8,55	0,06	7,38	0,04	8,23	0,00	7,73	0,06	8,31	0,07	8,51	0,06	7,17	0,03	7,55	0,01
140	8,62	0,02	0	8,56	0,10	2	0,21	8,62	0,04	4,81	0,10	8,52	0,01	8,6	0,07	0	0	0	0,00
141	8,60	0,52	0	8,71	0,02	0	0	8,69	0,01	5,28	0,05	8,65	0,04	8,61	0,05	8,66	0,06	8,27	0,02

\**Lactobacillus acidophilus* (Danisco-Howaru); *Bifidobacterium lactis* (Danisco-Howaru); *Lactobacillus paracasei* CCT 6488; *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863; *Lactobacillus casei* ATCC 393; *Lactobacillus delbrueckii* CCT 1644. \*\*Contagem de células viáveis (log UFC/mL) antes (T0) e após a exposição à solução de pepsina pH 2,5 e 3, por 3 horas (T3) a 37 °C. \*\*\* Contagem de células viáveis (log UFC/mL) antes (T0) e após a exposição à solução com pancreatina (sem e com a presença de 0.5% sais biliares pH 8) por 4 horas (T4) a 37 °C. Média (desvio padrão), n=2.

## ANEXO B

Taxa da sobrevivência (%) dos isolados expostos às condições ambientais do TGI.

Taxa de sobrevivência a exposição das condições ambientais do TGI (%)								
Isolado	Suco gástrico**				Suco intestinal***			
	pH 2,5		pH 3		0% sais biliares		0,5% sais biliares	
<i>L. acidophilus</i> *	59,61	1,54	86,23	0,43	99,98	0,76	100	11,97
<i>B. lactis</i> *	73,17	1,42	89,63	2,60	100	6,59	100	3,55
<i>L. paracasei</i> *	77,81	2,16	96,56	0,69	100	0,07	100	5,73
<i>L. plantarum</i> *	40,58	0,72	78,24	0,29	98,50	0,21	100	3,07
<i>L. rhamnosus</i> *	68,22	2,83	60,19	1,59	99,91	0,19	76,76	1,89
<i>L. casei</i> *	81,96	2,19	90,11	1,19	99,59	0,09	100	1,18
<i>L. delbrueckii</i> *	72,46	1,56	79,39	1,29	89,11	0,10	87,19	1,46
1	39,93	1,69	55,90	0,62	99,77	0,18	88,49	0,81
2	75,08	1,12	88,35	3,31	97,89	0,16	56,59	0,14
4	86,57	1,03	86,24	0,84	99,38	0,58	97,43	0,37
5	41,16	1,17	72,75	0,27	100,0	1,95	100,0	2,12
6	63,47	2,19	45,36	1,11	100,0	0,32	0	0
7	47,62	1,66	79,71	1,29	100,0	1,36	64,29	2,02
8	61,13	1,23	80,95	2,81	100	0,52	71,10	2,40
10	33,78	0,79	74,94	0,19	98,67	0,55	95,89	0,64
11	63,82	0,82	83,25	0,16	100	0,23	0	0
12	100	1,42	100	2,78	86,76	0,69	85,87	1,46
13	84,93	1,12	99,76	0,39	100	0,30	90,52	2,63
15	0	0	0	0	96,60	0,33	0	0

17	46,93	0,87	96,93	0,06	100	0,94	79,74	1,25
18	76,19	1,10	78,51	0,31	100	0,52	100	0,69
19	72,57	2,11	99,23	0,00	100	0,47	96,62	1,39
20	41,96	0,83	53,28	0,54	100	0,36	97,50	1,69
21	64,48	2,33	93,46	0,10	100	1,30	0	0
22	26,35	0,39	50,17	1,97	100	1,03	83,77	8,23
23	0	0	31,20	0,29	100	0,09	100,0	0,29
24	73,65	1,36	100,0	0,83	99,99	0,94	90,88	1,28
25	47,97	3,06	68,53	2,25	99,37	1,79	94,62	0,77
26	82,37	0,77	97,87	0,07	100	0,23	45,21	3,44
28	58,32	0,86	57,86	0,04	99,74	0,84	97,49	0,83
29 b	25,99	2,01	63,86	0,44	97,33	1,07	90,28	0,74
29p	41,03	2,56	84,23	1,71	94,17	1,37	63,89	0,02
30	75,38	0,15	92,39	1,34	98,17	0,73	42,18	0,83
31	74,84	0,12	54,15	1,44	98,85	0,36	90,68	0,31
32	72,48	3,95	94,66	0,40	100	0,24	63,11	0,42
33	80,96	0,40	95,30	0,20	94,59	0,67	100	1,29
34	60,71	2,06	80,47	0,21	97,87	1,46	0	0
36	74,10	2,08	81,78	1,60	100	3,13	0	0
37	37,30	1,16	88,81	0,45	99,57	0,06	0	0
38	96,90	1,13	93,75	1,24	91,24	1,93	70,58	0,06
39	33,29	3,08	86,73	0,27	100	5,44	79,93	2,93
40	47,81	1,83	90,91	4,96	98,59	0,03	96,41	1,89
41	67,85	1,08	92,30	0,17	100	1,77	100	17,46
42	30,78	4,99	85,68	2,05	99,82	0,77	62,97	2,11
43	78,06	0,27	93,07	1,07	98,73	0,55	40,88	0,34
44	0	0	70,11	1,91	99,48	0,42	93,15	0,01
46	80,21	0,01	80,48	1,52	78,12	1,79	85,89	0,70
47	38,49	3,73	44,78	2,18	97,12	2,32	0	0
47a	41,13	0,65	100	0,66	100	2,84	0	0
47b	38,50	0,58	47,75	0,84	96,41	2,14	27,03	0,88
48	45,38	1,18	92,96	4,81	100	0,76	0	0
50	43,78	1,38	79,34	2,17	88,93	0,75	0	0
50a	44,93	0,00	81,37	1,18	92,69	0,13	88,87	0,22
50b	45,42	0,45	77,15	5,11	96,02	1,02	0	0
51	70,53	0,11	89,87	0,70	100	0,54	100	3,23
52	84,10	0,29	95,11	0,48	99,81	1,09	0	0
53	33,86	1,75	84,61	1,11	97,78	2,45	0	0
55	0	0	41,13	1,82	99,97	0,54	0	0
56	51,73	2,86	77,66	2,34	100	2,21	0	0

57	40,01	0,79	90,95	0,41	100	0,68	89,47	2,33
58	40,12	0,14	47,76	0,10	90,59	0,87	59,78	1,71
59	0	0	74,66	0,09	98,34	0,47	0	0
60	67,46	0,58	74,66	0,58	99,05	2,21	47,37	3,27
61	0	0	83,88	1,28	100	2,77	0	0
62	23,36	0,82	47,20	0,03	94,16	1,37	31,54	1,35
64	100	3,36	100	1,02	100	2,55	37,37	0,96
65b	39,30	1,17	71,89	1,11	100	0,06	72,50	0,08
66	47,32	1,22	91,78	0,95	100	0,01	90,58	0,08
67	40,66	0,65	92,67	3,41	98,71	0,86	0	0
69	73,75	1,11	91,27	0,00	100	0,56	0	0
70	81,23	1,73	95,55	0,32	98,44	0,17	60,73	3,06
71	38,38	1,72	100	0,95	100	1,26	42,19	1,62
73	79,91	1,40	79,33	2,16	100	0,43	63,83	1,02
74	62,50	1,91	90,16	0,06	100	0,65	0	0
75B	41,04	0,45	81,18	0,49	100	0,15	100	0,23
75C1	37,70	0,88	0	0	100	0,35	40,71	0
75C2	55,89	1,05	95,45	0,44	95,41	1,68	0	0
76	62,82	2,30	85,09	2,05	99,26	0,55	0	0
78a	62,59	0,04	92,47	0,37	100	0,61	0	0
78b	42,41	2,25	92,66	2,66	100	0,11	0	0
80	45,78	0,49	79,52	1,70	100	0,01	45,42	1,15
82	88,30	1,29	89,00	2,06	98,74	0,05	79,60	0,90
88a	87,36	0,15	97,79	0,58	100	0,58	0	0
89	49,64	1,93	93,99	0,22	99,67	0,56	0	0
93p	0	0	81,24	0,34	97,66	0,77	0	0
98	43,98	7,43	78,90	2,61	99,98	0,74	74,39	1,31
99	40,73	6,86	54,47	1,06	98,69	0,11	59,39	1,43
103	20,59	2,16	72,91	0,11	100	2,77	86,26	1,90
104	29,03	3,37	70,20	2,05	96,13	1,87	70,77	0,59
107	53,08	1,48	83,59	0,07	100	0,38	95,77	0,39
108	70,41	4,38	95,57	1,71	100	0,75	0	0
109	0	0	85,69	6,80	96,32	0,70	0	0
112	37,22	0,49	63,56	0,60	98,42	0,82	82,84	0,14
113	38,92	1,94	75,72	6,16	100	0,33	73,47	1,79
114	72,02	0,79	83,10	1,52	98,15	0,98	73,28	3,86
115	26,91	0,48	32,73	5,43	91,87	0,98	83,16	1,40
116	67,92	0,43	94,43	1,43	100	0,77	72,15	1,85
117	54,06	2,97	99,84	1,34	98,58	0,67	96,05	4,21
118	91,87	2,68	82,77	0,28	96,60	1,33	78,64	1,94

119	0	0	77,83	0,24	100	0,34	0	0
120	28,53	0,55	65,27	0,30	99,37	1,17	0	0
121	88,03	0,52	97,13	1,76	100	0,98	100	0,91
123	0	0	76,29	0,61	99,76	0,45	50,20	2,03
124	94,33	0,68	91,13	2,60	94,92	0,37	100	8,99
129	20,66	0,67	64,34	0	98,76	1,69	0	0
130	20,45	0,12	69,90	3,32	98,46	1,10	50,01	1,62
131	81,42	1,01	92,45	1,04	91,52	1,90	86,18	0,22
132	85,05	1,42	95,33	0,62	100	0,62	0	0
133	52,34	0,32	83,85	0,12	100	0,44	42,06	0,12
134	34,14	3,80	90,49	3,56	100	0,23	87,84	0,32
135	85,53	0,27	97,34	1,15	100	0,58	100	0,35
136	62,48	4,04	90,72	2,18	100	1,75	96,62	0,22
137	33,83	1,05	77,24	0,27	99,12	1,40	89,19	0,96
138	0	0	68,60	2,12	100	0,64	95,15	0,10
139	88,81	0,75	93,02	0,74	100	0,19	100	0,60
140	23,36	2,50	55,78	0,85	100	1,00	0	0
141	0	0	60,76	0,59	99,50	0,12	95,47	0,42

\**Lactobacillus acidophilus* (Danisco-Howaru); *Bifidobacterium lactis* (Danisco-Howaru); *Lactobacillus paracasei* CCT 6488; *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863; *Lactobacillus casei* ATCC 393; *Lactobacillus delbrueckii* CCT 1644. \*\* Taxa de células viáveis (%) após exposição à solução de pepsina pH 2,5 e 3, por 3 horas a 37 °C. \*\*\* Taxa de células viáveis (%) após a exposição à solução com pancreatina (sem e com a presença de 0.5% sais biliares pH 8) por 4 horas a 37 °C. Média (desvio padrão), n=2.

## ANEXO C

Densidade ótica dos isolados por tempo de incubação.

Microrganismo	Densidade Ótica							
	Tempo (h)							
	3	6	9	15	24	29	32	48
	1,09	1,60	2,53	9,30	11,70	12,78	11,62	11,72
<i>L. acidophilus</i>	(0,04)	(0,03)	(0,02)	(0,11)	(0,22)	(0,54)	(0,54)	(0,18)
	0,70	1,59	4,47	9,30	11,00	11,82	11,17	11,32
<i>L. plantarum</i>	(0,09)	(0,17)	(0,17)	(0,33)	(0,13)	(0,74)	(0,85)	(0,50)
	0,49	1,61	4,78	7,70	10,00	10,56	9,17	9,30
<i>L. parabuchneri</i> ML4	(0,26)	(0,10)	(0,06)	(0,50)	(0,14)	(0,32)	(0,63)	(0,62)
	0,84	0,94	0,95	3,30	4,70	6,54	4,72	6,64
<i>L. paracasei</i> ML13	(0,01)	(0,11)	(0,03)	(0,03)	(0,12)	(0,36)	(0,21)	(0,28)
	1,14	4,44	6,46	6,10	5,80	10,51	11,70	10,21
<i>L. paracasei</i> ML24	(0,07)	(0,11)	(0,19)	(0,75)	(0,24)	(0,73)	(0,37)	(0,62)
	0,85	0,69	1,10	5,20	7,30	8,86	9,53	11,28
<i>L. paracasei</i> ML33	(0,09)	(0,08)	(0,15)	(0,15)	(0,40)	(0,07)	(0,01)	(0,17)
	0,78	1,23	3,13	7,00	9,80	9,85	9,89	9,40
<i>L. pentosus</i> ML82	(0,13)	(0,13)	(0,09)	(0,10)	(0,05)	(0,21)	(0,26)	(0,12)
	0,77	1,58	2,95	5,30	7,10	9,01	9,23	11,28
<i>E. faecalis</i> CH121	(0,04)	(0,19)	(0,03)	(0,14)	(0,82)	(1,02)	(0,73)	(0,51)
	0,67	1,21	2,44	5,30	8,10	9,99	10,44	10,24
<i>L. plantarum</i> CH131	(0,01)	(0,01)	(0,01)	(0,43)	(0,36)	(1,02)	(0,33)	(0,24)

	0,93	0,87	3,16	9,50	12,18	12,94	11,49	11,84
<i>L. paracasei</i> CH135	(0,10)	(0,03)	(0,14)	(0,07)	(0,23)	(0,06)	(0,14)	(0,03)
<i>L. paracasei</i> CH139	1,07	1,15	2,75	9,10	12,3	11,22	11,11	11,91
	(0,01)	(0,01)	(0,01)	(0,43)	(0,63)	(1,02)	(0,33)	(0,51)

Média ± desvio padrão (n=2).

Relação da densidade ótica e do crescimento do isolados (log UFC.mL<sup>-1</sup>).

